

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Immunhistochemischer Nachweis von Kathepsin F und X in Normalgeweben und Malignomen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von
Enrico Schalk
aus Wernigerode

Magdeburg 2006

Dokumentationsblatt

Bibliographie

Schalk, Enrico: Immunhistochemischer Nachweis von Kathepsin F und X in Normalgeweben und Malignomen. - 2006. - 73 Bl.: 14 Abb., 11 Tab., 1 Anl.

Kurzreferat

Einleitung: Die Kathepsine F und X gehören zu den heute elf bekannten lysosomalen Cystein-Proteasen der Papain-Familie. Einigen Kathepsinen wird eine bedeutende Rolle an den Prozessen der Tumorgenese und Metastasierung zugeschrieben. Die funktionelle Bedeutung der erst kürzlich beschriebenen Kathepsine F und X ist noch nicht ausreichend geklärt. Anhand dieser Arbeit sollte immunhistochemisch untersucht werden, ob die Kathepsine F und X bei malignen Tumoren eine Rolle spielen.

Material und Methoden: Es wurden an in Paraffin eingebetteten Präparaten (n=83) immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Kathepsin F und X durchgeführt. Dabei wurden sowohl epitheliale (n=61) als auch mesenchymale (n=22) maligne Tumoren untersucht. Die Immunreaktivität des Normalgewebes wurde mit der des malignen Gewebes verglichen. Es wurde dafür ein Punktesystem verwendet. An Frischmaterial (n=8) wurde zur Verifizierung der Immunhistochemie für Kathepsin F und X ein Western Blot mit Normal- und Malignomgewebe durchgeführt.

Ergebnisse: Kathepsin F wird weder in Normal- noch in Tumorgewebe exprimiert. Hingegen ist Kathepsin X sowohl in Normal- als auch in Tumorgewebe jeweils schwach positiv. In epithelialen Malignomen ist Kathepsin X gegenüber mesenchymalen Malignomen vermehrt nachweisbar. Kathepsin X wird sowohl in epithelialen als auch in mesenchymalen G3-Tumoren stärker exprimiert als in G2- und G1-Tumoren.

Schlussfolgerungen: Die Bedeutung von Kathepsin F ist noch unklar, da es hier in Normal- und Tumorgewebe nicht nachweisbar ist. Kathepsin X scheint bei einigen ausgewählten Malignomen eine Rolle zu spielen und ist möglicherweise an physiologischen Prozessen im Dünndarm, in der Leber, in der Niere sowie im Immunsystem beteiligt.

Schlüsselwörter

Kathepsin F, Kathepsin X, Immunhistochemie, maligne Tumoren

Inhaltsverzeichnis

	Blatt
Dokumentationsblatt.....	2
Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	4
1 Einleitung.....	6
1.1 Maligne Tumorerkrankungen.....	7
1.2 Die Kathepsine.....	9
1.2.1 Überblick.....	9
1.2.2 Kathepsin F (EC 3.4.22.41).....	15
1.2.3 Kathepsin X (EC 3.4.18.1).....	18
1.3 Fragestellung.....	21
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Patienten und Untersuchungsmaterial.....	23
2.2 Kathepsin F und X sowie die entsprechenden Antikörper.....	24
2.3 Immunhistochemie.....	25
2.4 Western Blot.....	28
2.5 Auswertung.....	32
3 Ergebnisse.....	33
3.1 Immunhistochemie.....	34
3.2 Western Blot.....	42
4 Diskussion.....	43
4.1 Rolle von Kathepsin F.....	48
4.2 Rolle von Kathepsin X.....	50
4.3 Schlussfolgerungen.....	53
5 Zusammenfassung.....	54
6 Literaturverzeichnis.....	56
7 Abbildungsverzeichnis.....	67
8 Tabellenverzeichnis.....	68
9 Anlage.....	69
Danksagung.....	71
Erklärung.....	72
Lebenslauf.....	73

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua dest.	Aqua destilata (lateinisch für <i>destilliertes Wasser</i>)
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin (englisch: <i>bovine serum albumin</i>)
C	Cystein
Ca	Karzinom
CD	Differenzierungscluster (englisch: <i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	kopierte Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>copy desoxyribonucleid acid</i>)
CTSF	Kathepsin F-Gen
CTSW	Kathepsin W-Gen
CTSX	Kathepsin X-Gen
D	Asparaginsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
E64	L-3-Carboxy-trans-2,3-epoxypropionyl-leucylamido-(4-guanidino)butan
EC	Enzymklassifikation
et al.	et alii (lateinisch für <i>und andere</i>)
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
IRW	Immunreaktivitätswert
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
M _r	relative Molekularmasse
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure (englisch: <i>messenger ribonucleic acid</i>)
N	Asparagin
Npl.	Neoplasie
n.s.	nicht signifikant
P	Prolin
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration

pI	isoelektrischer Punkt
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat (englisch: <i>sodium dodecyl sulfat</i>)
T	Threonin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (englisch: <i>tris buffered saline</i>)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNM	Klassifikation maligner Tumoren nach Ausdehnung des Primärtumors (T), regionäre Lymphknotenmetastasen (N), Fernmetastasen (M)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)aminomethan
Tween	Polyethylenglykolsorbitanlaurinsäureester
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

1 Einleitung

Maligne Tumoren zeichnen sich durch ihr invasiv und destruierendes Wachstum und die Fähigkeit zur Bildung von sekundären Tumorabsiedlungen aus. Dieser als Metastasierung bezeichnete Prozess ist keineswegs ein zufälliger, sondern vielmehr ein kaskadenförmiger. Über 30% der Patienten mit neu entdeckten soliden Tumoren befinden sich in einem Stadium mit Fernmetastasen und haben damit eine deutlich schlechtere Prognose bezüglich des Überlebens. Eine bedeutende Rolle in der Tumorgenese, und damit der Metastasierung, wird den Eiweiß spaltenden Enzymen - den Proteasen - zu teil. Seit langem ist die Rolle von Proteasen in der intrazellulären Proteolyse und im Proteinumsatz bekannt. Proteasen stimulieren direkt oder indirekt das *Wachstum* von Tumorzellen. Ab einem Tumordurchmesser von 2 mm muss der Tumor für den Sauerstoff- und Nährstofftransport ein neues Gefäßsystem entwickeln. Dieser Prozess der *Tumorangiogenese* erfordert ein Wachstum von Endothelzellen in das Tumorgewebe in einer Art und Weise ähnlich der Tumordinvasion. Die *Invasion* von Tumorzellen in angrenzendes Normalgewebe erfordert eine Degradation der extrazellulären Matrix, welche eine Barriere bezüglich einer Dissemination von Tumorzellen darstellt. Während der Phase der hämatogenen *Metastasierung* müssen Tumorzellen die Basalmembranen der Endothelien überwinden bzw. durchdringen, um in das Gefäßsystem zu gelangen (Intravasation) und dann anschließend das Gefäßsystem wieder zu verlassen (Extravasation). Dort invadieren Tumorzellen das Zielgewebe und formieren einen sekundären Tumor, welcher letztendlich auch neue Metastasen bilden kann [Liotta & Stetler-Stevenson, 1993; Berquin & Sloane, 1994; Kirschke *et al.*, 1995; Berquin & Sloane, 1996, Böcker *et al.*, 1997].

In den Prozessen der Metastasierung von Tumoren sind auch lysosomale Cystein-Proteasen involviert. Diese waren bzw. sind immer noch Forschungsschwerpunkte. Es lag die Vermutung nahe, dass auch die neuerlich entdeckten lysosomalen Cystein-Proteasen Kathepsin F und X an der Tumorgenese beteiligt sind. Des Weiteren ist noch nicht abschließend geklärt, in welchen Geweben Kathepsin F und X überhaupt, d. h. physiologisch exprimiert werden. In der vorliegenden Arbeit soll speziell auf diese Fragen eingegangen werden.

1.1 Maligne Tumorerkrankungen

Tumoren lassen sich von ihrem Phänotyp her in zwei große Hauptgruppen, den epithelialen und mesenchymalen Tumoren, differenzieren. Zu den epithelialen Tumoren gehören die epithelialen Tumoren i. e. S. sowie die neuroendokrinen und die sich vom Neuroektoderm ableitenden Tumoren. Die Gruppe der mesenchymalen Tumoren stammen von den verschiedenen mesenchymalen Geweben (Binde- und Stützgewebe, Muskulatur) ab. Sonderformen der mesenchymalen Tumoren sind die vom Knochenmark und vom lymphatischen System ausgehenden Neoplasien. Eine kleinere Gruppe von Tumoren entwickelt sich aus Keimzellen und aus dem embryonalen Gewebe. Einige Neoplasien weisen epitheliale und mesenchymale Komponenten auf (sog. Mischtumoren). Maligne epitheliale Tumoren, sog. Karzinome, machen ca. 80% aller Malignome aus. Die malignen mesenchymalen Tumoren werden zumeist Sarkome genannt und kommen wesentlich seltener als Karzinome vor [Böcker *et al.*, 1997].

Tumorerkrankungen spielen in unserer Zeit eine große und ernst zunehmende Rolle. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind fast ein Achtel der Todesursachen im Jahr 2001 auf bösartige Tumoren zurückzuführen [WHO, 2002]. Dabei überwiegt leicht das männliche Geschlecht. Im Zeitraum von 1998 bis 2000 war zu beobachten, dass die Mortalitätsrate um ein Prozent (für beide Geschlechter insgesamt) zurückging. Insgesamt gesehen, bleibt aber die Mortalitätsrate für Tumoren relativ konstant (Abb. 1).

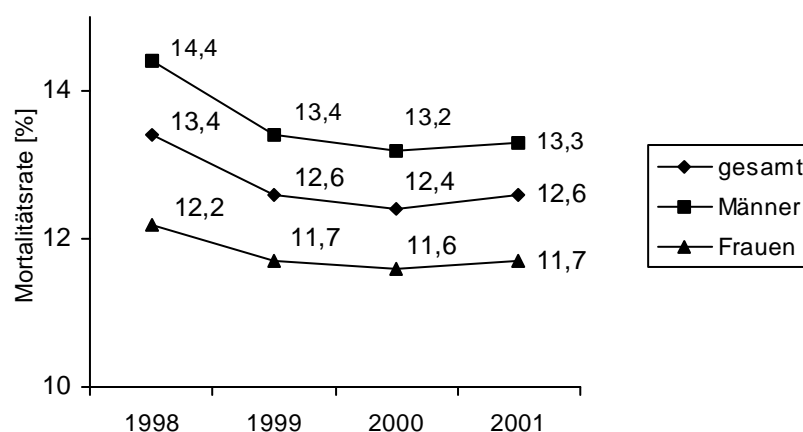


Abb. 1: Weltweite Mortalitätsrate bedingt durch Malignome [WHO, 1999; 2000; 2001; 2002].

In der Häufigkeit der Todesursachen weltweit rangieren die malignen Tumoren mit ca. 12% auf Platz drei. Davor liegen die Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (ca. 30%) und die Infektionen (ca. 19%) (Angaben für das Jahr 2001) [WHO, 2002]. Für Deutschland betrachtet, liegen die Neubildungen hinter den Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems auf Rang zwei (Zeitraum 1998-2000) [Statistisches Bundesamt, 2003a]. Ferner konnte man feststellen, dass im Jahr 2000 7,5% aller verstorbenen Männer einen Lungentumor (im weitesten Sinne) und 4,0% aller verstorbenen Frauen einen Tumor der Brustdrüse als Todesursache aufwiesen (Tab. 1) [Statistisches Bundesamt, 2003b]. In Deutschland werden die jährlichen Neuerkrankungen an Malignomen auf ca. 218.250 bei den Männern und auf ca. 206.000 bei den Frauen geschätzt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für beide Geschlechter bei etwa 69 Jahren. Die häufigsten Neuerkrankungen sowie die häufigsten Sterbefälle an Malignomen sind in den Tab. 2 und 3 dargestellt [GEKID & RKI, 2006].

Männer [%]		Frauen [%]	
Chron. ischämische Herzkrankheit	9,8	Chron. ischämische Herzkrankheit	12,2
Akuter Myokardinfarkt	9,4	Herzinsuffizienz	8,8
Lungenkrebs	7,5	Akuter Myokardinfarkt	6,9
Herzinsuffizienz	4,5	Schlaganfall	6,3
Schlaganfall	3,8	Brustkrebs	4,0

Tab. 1: Sterbefälle in Deutschland im Jahr 2000, nach den fünf häufigsten Todesursachen (ohne Totgeborene und ohne gerichtliche Todeserklärungen), getrennt nach Geschlecht [Statistisches Bundesamt, 2003b].

Männer [%]		Frauen [%]	
Prostata	22,3	Brustdrüse	26,8
Darm	16,3	Darm	17,4
Lunge	14,9	Lunge	6,1
Harnblase	8,6	Corpus uteri	5,5
Magen	5,1	Eierstöcke	4,8
Niere	4,7	Magen	4,0
Mundhöhle, Rachen	3,6	Malignes Melanom	3,7
Pankreas	2,8	Harnblase	3,5
Weitere	21,7	Weitere	28,2

Tab. 2: Inzidenz der häufigsten Malignome in Deutschland im Jahr 2002 [GEKID & RKI, 2006].

Männer		Frauen	
Lunge	26,3	Brustdrüse	17,8
Darm	12,8	Darm	14,9
Prostata	10,4	Lunge	10,4
Magen	6,0	Pankreas	6,7
Pankreas	5,6	Eierstöcke	5,9
Niere	3,5	Magen	5,8
Mundhöhle, Rachen	3,4	Leukämien	3,4
Leukämien	3,2	Non-Hodgkin-Lymphome	2,7
Weitere	28,8	Weitere	32,4

Tab. 3: Sterbefälle an den häufigsten Malignomen in Deutschland im Jahr 2002 [GEKID & RKI, 2006].

1.2 Die Kathepsine

1.2.1 Überblick

Begriffsbestimmungen und Klassifizierungen

Der Terminus „Kathepsin“ wurde 1929 von Willstätter und Bamann in die Literatur eingeführt [Willstätter & Bamann, 1929]. Abgeleitet wurde er vom Griechischen für „Verdauen“. Kathepsin beschrieb zunächst nur eine Protease in Leukozyten der Magenschleimhaut bei schwach saurer Reaktion. Nach der Entdeckung der Lysosomen durch de Duve und Kollegen im Jahr 1955 fand man heraus, dass das endosomal-membranöse System der Zellen aus verschiedenen Kompartimenten besteht. Der Begriff Lysosom rührt daher, dass jene Organellen reich an hydrolytischen Enzymen sind [de Duve *et al.*, 1955]. Heute verstehen wir unter Kathepsinen intrazelluläre Proteasen, welche in Lysosomen lokalisiert und bei saurem bis neutralem pH aktiv sind.

Die Klassifizierung der Proteasen erfolgt nach ihrem Angriffspunkt am Substrat in Endo- und Exopeptidasen sowie nach ihrem aktiven Zentrum in Cystein-, Serin-, Aspartat- oder Metalloproteasen [Barrett, 1994]. Exopeptidasen spalten Peptidbindungen ($R_1\text{-CO-NH-R}_2$) entweder am Amino- (N-) oder Carboxylterminus (C-). Es können so Mono-, Di- oder Tripeptide freigesetzt werden. Endopeptidasen agieren dagegen im Inneren der Peptidketten - entfernt der N- oder C-Termini. Die Exopeptidasen werden auch *Peptidasen* und die Endopeptidasen *Proteinasen* genannt.

Die große Gruppe der Cystein-Proteasen werden nach Barrett und Rawlings aufgrund der Aminosäuresequenzen und Proteinstrukturen in verschiedene Clans und Familien eingeteilt [Barrett & Rawlings, 2001]. So gehören die hier betrachteten Kathepsine vom Cystein-Typ zur Familie C1 und Clan CA (dabei steht C für Cystein). Der „Urtyp“ der C1-Familie ist Papain. Papain - aus dem mexikanischen Melonen-

baum *Carica papaya* - ist das am besten untersuchte Enzym der Gruppe der Cystein-Proteasen. So wurde die Tertiärstruktur jener Enzyme zum ersten Mal bei Papain aufgeklärt [Ménard & Storer, 1998]. Dass Papain der Namensgeber der Familie ist, zeigt, dass die Cystein-Proteasen eben nicht nur beim Menschen, sondern auch in Pflanzen, Bakterien und Urtierchen gefunden werden.

Die Kathepsine B, C, F, H, K, L, O, S, V, W und X werden zu den Cystein-Proteasen der Papain-Familie zusammengefasst. Weitere Kathepsine, die nicht zum Cystein-Typ zählen sind: Kathepsin D und Kathepsin E (beide Aspartat-Proteasen) sowie Kathepsin A und G (beide Serin-Proteasen), die hier jedoch nicht näher betrachtet werden sollen [Brömme *et al.*, 1999; Turk *et al.*, 2000; Turk *et al.*, 2001].

Biochemie

Die Kathepsine untereinander haben eng verwandte Aminosäuresequenzen und damit auch Verwandtschaftsverhältnisse. Trotz dieser Ähnlichkeiten gibt es große Unterschiede in ihrer proteolytischen Aktivität [Turk *et al.*, 1993]. Für die Kathepsine wurden Proregionen mit unterschiedlichen Längen beschrieben. Diese Proregionen scheinen wichtig für die korrekte Faltung der neu synthetisierten Polypeptidketten sowie für die Stabilisierung des Proteins gegen Denaturierung im neutralen bis alkalischen pH-Bereich zu sein [Tao *et al.*, 1994]. Möglich scheint auch die Beteiligung an der Regulierung der Aktivierung des reifen Kathepsins. Eine Inhibition *in vitro* von Kathepsinen durch ihre eigenen Propeptide ist bekannt. So können die Propeptide der Kathepsine K, L und S ihre eigenen maternalen Enzyme sowie die reifen nicht-maternalen Enzyme hemmen [Guay *et al.*, 2000; Wiederanders, 2000].

Die Kathepsine werden als inaktive Vorstufen synthetisiert. Sie können sowohl als Proenzyme sezerniert werden als auch Anschluss zum endosomal/lysosomalen Kompartiment via Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Weg finden, wo sie zu reifen und aktiven Enzymen für anschließende intrazelluläre Funktionen oder extrazelluläre Sekretion prozessiert werden. Die enzymatische Aktivität wird durch posttranslationale Modifikation, Lokalisation, Reifung, pH-Änderung und der Interaktion mit ihren Inhibitoren reguliert [Bühling *et al.*, 2000].

Die katalytische Aktivität der hier näher zu betrachtenden Kathepsine der Papain-Familie ist bedingt durch einen Cystein-Rest im katalytischen Zentrum, welcher mit einem Histidin-Rest ein Thiolat-Imidazol-Ionenpaar bildet [Storer & Ménard, 1994]. Dieser katalytische Mechanismus ist für das pH-Optimum im sauren Bereich verantwortlich und ermöglicht eine Aktivität der Kathepsine innerhalb der Lysosomen [Bossard *et al.*, 1996; Brömme *et al.*, 1996].

Bis heute sind nur wenige Regulationsmechanismen der Genexpression der Kathepsine bekannt. Die Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und transformierender Wachstumsfaktor- β 1 (TGF- β 1, transforming growth factor- β 1) scheinen an der Regulation von Kathepsin L auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene involviert zu sein. So konnte an Bronchialepithelzelllinien gezeigt werden, dass die Inkubation dieser Zellen mit IL-6 zu einer Erhöhung der Expression von Kathepsin L und zu einer leichten Verminderung von Kathepsin B führt. Im Gegensatz dazu konnte TGF- β 1 die Expression von Kathepsin L reduzieren [Gerber *et al.*, 2000].

Die physiologische Inhibition der Kathepsine erfolgt durch die endogen vorhandenen Proteininhibitoren der Cystatin-Superfamilie, wozu die Steffine, Cystatine und Kininogene gehören. Steffine und Cystatine sind nur halb so groß wie Kathepsine und binden reversibel, aber stark an Cystein-Proteasen [Turk *et al.*, 1997]. Im extrazellulären Milieu ist Cystatin C der hauptsächliche Inhibitor, wobei es jedoch schnell zur teilweisen Dissoziation der Enzym-Inhibitor-Komplexe bei saurem pH-Wert kommt [Turk *et al.*, 1993]. Ein Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Inhibitoren kann verschiedene Krankheiten hervorrufen. So ist z. B. eine Mutation im Cystatin B-Gen, und damit eine Verminderung in dessen Aktivität, mit einer autosomal-rezessiv vererbaren Stoffwechselerkrankung vergesellschaftet, die mit Myoklonusepilepsie einhergeht (Unverricht-Lundborg-Syndrom) [Pennacchio *et al.*, 1996]. Weitere Inhibitoren sind α_2 -Makroglobulin (irreversibel) und Chloroquin (reversibel). Ein spezifischer Inhibitor der Cystein-Proteasen ist E64 [Kirschke & Barrett, 1987].

Die meisten Kathepsine besitzen Endopeptidasenaktivität (Kathepsin B, F, H, K, L, S und V). Die Kathepsine B, C, H und X hingegen können Mono- bzw. Dipeptide vom C- bzw. N-terminalen Ende der Proteine abspalten. Sie sind somit Exopeptidasen. Sowohl Endo- als auch Exopeptidasenaktivität lässt sich den Kathepsinen B und H zuschreiben. Kathepsin O und W können bezüglich der Peptidasenaktivität (noch) nicht näher kategorisiert werden [Turk *et al.*, 2001].

Verwandtschaftsverhältnisse

Aufgrund von Sequenzhomologien und das Vorhandensein hoch konservierter Aminosäuremotive in den Propeptiden können die lysosomalen Cystein-Proteasen in drei Gruppen eingeteilt werden: Zum einen die Gruppe der Kathepsin L-ähnlichen, wozu die Kathepsine L sowie H, K, S und V gehören, und zum anderen die Gruppe der Kathepsin B-ähnlichen (nur Kathepsin B als Vertreter) und die Gruppe der Kathepsin F-ähnlichen (Kathepsin F und W). Die Kathepsine C, O und X lassen sich nicht derartig kategorisieren [Wex *et al.*, 1999]. Die Kathepsine der L-Gruppe zeigen in ihrem Propeptid das Aminosäuremotiv ERW/FNIN (Abkürzung der Aminosäuren als Ein-

Buchstaben-Code), weshalb sie auch ERW/FNIN-Proteasen genannt werden. Im Gegensatz dazu findet sich bei der F-Gruppe das Motiv ERFNAQ. Bei der B-Gruppe sowie bei den Kathepsinen C, O und X lassen sich solche Motive nicht erkennen. Eine Darstellung der entwicklungsgeschichtlichen Verwandtschaftsverhältnisse findet sich in Abb. 2.

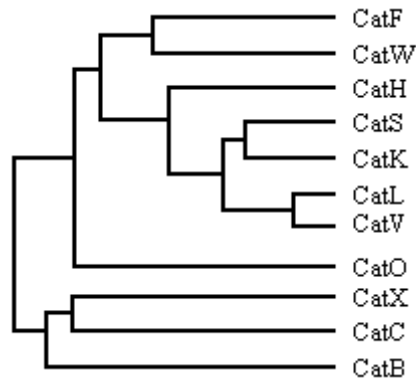


Abb. 2: Schematische Darstellung der phylogenetischen Beziehungen der humanen Cystein-Proteasen der Papain-Familie [Santamaría *et al.*, 1999]. Cat = Kathepsin.

Vorkommen und Funktionen

Im Folgenden sollen einige physiologische und pathophysiologische Funktionen einzelner Kathepsine beschrieben werden. Die Auflistung aller ihrer möglichen Bedeutungen ist zu umfangreich, als dass sie hier im Einzelnen beschrieben werden können.

Die Cystein-Proteasen der Papain-Familie sind Enzyme, welche bei Bakterien, Pflanzen, Nicht-Wirbeltieren und Wirbeltieren gefunden werden. Nur für drei der elf bis heute bekannten humanen lysosomalen Cystein-Proteasen der Papain-Familie konnte eine Zelltyp-spezifische Expression beschrieben werden [Linnevers *et al.*, 1997]. Kathepsin K wurde hauptsächlich in Osteoklasten [Tezuka *et al.*, 1994], Kathepsin S in Makrophagen/Monozyten [Shi *et al.*, 1994] und Kathepsin W in CD8-T-Lymphozyten [Linnevers *et al.*, 1997] nachgewiesen. Die meisten der Kathepsine sind somit ubiquitär in den Geweben des menschlichen Organismus zu finden und werden auch „house-keeping proteines“ genannt. Die Beteiligung der Kathepsine am lysosomalen Proteinkatabolismus gilt als gesichert [Kirschke & Barrett, 1987; Kirschke & Barrett, 1995]. Neben diesen eher unspezifischen Abbauvorgängen werden den Kathepsinen auch spezifische Funktionen zugeschrieben. So sind die Kathepsine z. B. an der Prozessierung von Prohormonen [Jutras & Reudelhuber, 1999], am programmierten Zelltod [Salvesen, 2001; Stoka *et al.*, 2001; Terman *et al.*, 2002] und an der Embryonal- bzw. Fetalentwicklung [Häckel *et al.*, 1999; Bühling *et al.*, 2000b] beteiligt. Ein Hauptschwerpunkt aktueller Forschungen beschäftigt sich mit Krankheitsbildern,

die mit einer Matrixdegradation einhergehen. Ein Funktionsverlust des Kathepsin C, bedingt durch eine Mutation im Kathepsin C-Gen, resultiert in der Palmoplantarkeratose mit Periodontopathie (Papillon-Lefèvre-Syndrom) [Toomes *et al.*, 1999]. Diese autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung geht einher mit erythematös geschwollener Gingiva und diffuser Hyperkeratose der Haut, v. a. an Händen, Füßen, Knien und Ellenbogen. Weiterhin kommt es gehäuft zu bakteriellen Infekten. Dieses Syndrom zeigt, dass Proteasen, wie Kathepsin C, nicht nur bei Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen, sondern auch bei physiologischen Prozessen von Bedeutung sind. Bei der beschriebenen Erkrankung besteht offenbar ein Ungleichgewicht zwischen Gewebeanbau und -abbau. Ebenfalls zeigt dieses Beispiel, dass Kathepsine nicht nur eine einzige spezifische Funktion im menschlichen Organismus zugeschrieben werden kann. Kathepsin C wird von verschiedenen epithelialen Geweben und Immunzellen exprimiert. Hauptfunktionen sind Proteindegradation und Proenzymaktivierung [Rao *et al.*, 1997]. Wie bereits dargestellt, ist Kathepsin K stark exprimiert in Osteoklasten. Kathepsin K wird demnach eine wichtige Rolle in der Knochenresorption zugesprochen [Garnero *et al.*, 1998; Saftig *et al.*, 2000]. Ein Fehlen von Kathepsin K, bedingt durch Mutation, führt zu einer autosomal-rezessiv vererbten lysosomalen Speicherkrankheit, der Pyknodysostose (Mukopolysaccharid-Speicherkrankheit Typ VI, Maroteaux-Lamy-Syndrom) [Gelb *et al.*, 1996]. Verschiedene Kathepsine, wie z. B. Kathepsin B, K und L, sollen an der Knochen- und Knorpeldestruktion bei rheumatoider Arthritis beteiligt sein [Esser *et al.*, 1994; Kekow *et al.*, 2000]. Weitere Krankheitsbilder, die hier nur erwähnt werden sollen, werden mit Kathepsinen in Zusammenhang gebracht: Osteoporose, Osteoarthritis, Alzheimer-Erkrankung, Muskeldystrophie, ischämische Erkrankungen, Lungenemphysem und Transplantatabstossung [Brömme, 1999].

Ein besonderes Augenmerk wird auf die Bedeutung der Kathepsine in der Tumorgenese gerichtet. Die Fähigkeit von Kathepsin B, extrazelluläre Matrix zu degradieren und die Beteiligung an der Invasion und Metastasierung wurde bereits 1984 beschrieben [Sloane & Honn, 1984]. Die Aktivität der Kathepsine B, H und L ist in fast allen Tumoren im Vergleich zu gesunden Geweben erhöht. Die Kathepsine werden als inaktive Vorstufen sezerniert und dann extrazellulär durch ein von den Tumorzellen - ähnlich den Makrophagen und Osteoklasten - geschaffenes saures Mikroenvironment aktiviert. Dieses saure Milieu bedingt auch die Dissoziation der Enzym-Inhibitor-Komplexe [Turk *et al.*, 1993; Sloane *et al.*, 1991; Kirschke, 1997]. Kathepsin B scheint nicht nur direkt an der Tumorprogression beteiligt zu sein, sondern auch indirekt, indem es andere, latente Proteasen aktiviert und/oder Proteininhibitoren anderer Proteasen degradiert [Yan *et al.*, 1998]. Kathepsine und deren Inhibitoren scheinen nicht nur eine bedeutende Rolle bei der Tumordinvasion, sondern auch in der Entwicklung von Prä-

kanzerösen zum Krebs zu spielen, was z. B. anhand des Magenkarzinoms gezeigt werden konnte [Farinati *et al.*, 1996]. Neben der Hochregulierung der Kathepsine findet man bei Tumoren auch eine Hochregulierung der spezifischen Inhibitoren. Man vermutet, dass hier eine Imbalance zwischen Kathepsinen und deren Inhibitoren besteht [Kos *et al.*, 2000].

Die Entwicklung potenter und selektiver Inhibitoren gegen die einzelnen Kathepsine sollte helfen, die physiologische Rolle dieser Enzyme näher zu beschreiben [Ménard *et al.*, 2001].

Therapeutische Ansätze

Hier sollen einige wenige Ansätze bezüglich einer Inhibition von Kathepsinen bei verschiedenen Krankheitsbildern aufgezeigt werden. Eines der bekanntesten Beispiele einer Inhibition einer humanen Protease, und damit Eröffnung einer therapeutischen Option, stellt sicherlich die Inhibition der Metalloprotease Angiotensin-Konvertierungsenzym (ACE, angiotensin converting enzyme) dar. ACE-Hemmer (wie z. B. Enalapril) werden heute erfolgreich in der Behandlung der arteriellen Hypertonie beim Menschen eingesetzt.

Fluoroketone können *in vitro* und *ex vivo* Kathepsin B und L in ihrer Aktivität hemmen und somit Gelenkschäden bzw. Knorpel- und Knochendestruktionen in Arthritis-Modellen verringern [Esser *et al.*, 1994]. Zur Behandlung der Osteoporose, wobei Kathepsin K involviert ist, könnten spezifische Kathepsin K-Inhibitoren eine Alternative zu Östrogenen oder Bisphosphonaten sein [Brömme, 1999].

Eine Transfektion von Osteosarkomzellen mit Antisense-Kathepsin-B-cDNA führt zu einer Reduktion der Invasion und Bewegung dieser Zellen *in vitro* im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen bzw. Kontrollen [Krüger *et al.*, 1999]. Diese Daten zeigen auch, dass offensichtlich Kathepsin B am Komplex des proteolytischen Prozesses beim invasiven Osteosarkom beteiligt ist.

Die Kathepsine B, F, K, S und V stehen im Fokus der Medikamentenentwicklung gegen Erkrankungen wie Asthma bronchiale, rheumatoide Arthritis, Malignome und Osteoporose [Somoza *et al.*, 2002]. Eine erfolgreiche Behandlung von malignen Tumoren mit Proteaseninhibitoren scheint nur möglich zu sein, wenn ein Multidrug-Ansatz gegen verschiedene Proteasen verwendet wird [Brömme, 1999].

Ob sich aus den genannten Beispielen bzw. Experimenten Grundlagen für eine Therapie am Menschen schaffen lassen, muss durch weitere Forschungen bzw. Studien gezeigt werden.

1.2.2 Kathepsin F (EC 3.4.22.41)

Nähere Charakterisierung

Kathepsin F wurde ziemlich zeitgleich Ende der 1990er von drei unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben [Wang *et al.*, 1998; Nägler *et al.*, 1999a; Santamaría *et al.*, 1999]. Wang *et al.* identifizierten Kathepsin F von einer cDNA-Bibliothek des Skelettmuskels [Wang *et al.*, 1998]. Es musste später allerdings festgestellt werden, dass die cDNA-Sequenz nicht vollständig war [Nägler *et al.*, 1999a; Santamaría *et al.*, 1999; Bühling *et al.*, 2000a], vielmehr wurde die Sequenz innerhalb der Proregion abgeschnitten. Dies hatte zur Folge, dass für Kathepsin F andere Eigenschaften beschrieben wurden, als es tatsächlich besitzt. So glaubten Wang *et al.*, dass Kathepsin F durch die fehlende Signalsequenz über einen anderen als den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Weg in das endosomale/lysosomale System gelangt [Wang *et al.*, 1998]. Nägler *et al.* und Santamaría *et al.* konnten das allerdings widerlegen: Das Vorhandensein einer Signalsequenz und fünf potentieller N-Glykosilierungsstellen (zwei in der Proregion, drei im reifen Enzym) bei Kathepsin F implizieren, dass dieses Enzym über den o. g. Rezeptorweg in das Kompartiment eingeschleust wird [Nägler *et al.*, 1999a; Santamaría *et al.*, 1999].

Das Kathepsin F-Gen CTSF, welches für 484 Aminosäuren kodiert, befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 11 in der Region q13.1-3 [Santamaría *et al.*, 1999; Wex *et al.*, 1999a], und damit ganz in der Nähe des Gens, welches für Kathepsin W kodiert (CTSW: 11q13) [Wex *et al.*, 1999a]. Damit stellt das Genpaar CTSF und CTSW das dritte innerhalb der Cystein-Proteasen der Papain-Familie dar. Die Gene der Kathepsine S und K sind gemeinsam in der Region 1q21 und die der Kathepsine L und V in der Region 9q21 lokalisiert. Die gemeinsamen chromosomalen Lokalisationen dieser Gene und die Ähnlichkeiten in den Primärsequenzen deuten daraufhin, dass die Genpaare durch Trennung von Genduplikationen entstanden sein müssen [Wex *et al.*, 1999a]. CTSF setzt sich aus 13 Exons und zwölf Introns zusammen [Wex *et al.*, 1999b]. Neun Splice-Stellen sind identisch mit denen von CTSW. Dagegen finden sich nur vier Übereinstimmungen bei den Genen der Kathepsine K, L, O und S [Wex *et al.*, 1999a].

Wie die meisten Proteasen wird Kathepsin F als inaktives Präproenzym synthetisiert. Santamaría und Kollegen berechneten dafür eine relative Molekularmasse M_r von 53.365 [Santamaría *et al.*, 1999]. Auf die Signalsequenz entfallen 19 und auf das Propeptid 251 Aminosäurereste (Abb. 3) [Nägler *et al.*, 1999a; Santamaría *et al.*, 1999]. Mit 251 Aminosäureresten ist das Propeptid von Kathepsin F das längste je beschriebene innerhalb der menschlichen Papain-Familie und unterscheidet sich damit

deutlich von den anderen Kathepsinen jener Familie. Die Propeptide der Kathepsin L-ähnlichen Kathepsine sind etwa 100 Reste und die der Kathepsin B-ähnlichen etwa 60 Reste lang. Nur die Kathepsine C (206 Reste) und X (38 Reste) scheinen Ausnahmen diesbezüglich zu sein [Turk *et al.*, 2000]. Das Propeptid von Kathepsin F ist aber nicht nur wegen seiner Länge in der Gruppe der Cystein-Proteasen einzigartig. Das Propeptid kann in drei Abschnitte gegliedert werden: Eine C-terminale Domäne (wie sie bei den Kathepsin L-ähnlichen Proteasen in der Proregion gefunden wird), ein etwa 50 Reste großes flexibles Verbindungspeptid sowie eine N-terminale Cystatin-ähnliche Domäne [Nägler *et al.*, 1999a]. Kathepsin F ist damit das erste (Pro-) Enzym der Cystein-Proteasen, welches eine Cystatin-ähnliche Domäne beinhaltet. Die meisten der stark konservierten Aminosäurereste der Kathepsin L-ähnlichen Enzyme finden sich auch in der Proregion von Kathepsin F wieder, einschließlich des ERFNIN-Motivs (ERFNAQ in Kathepsin F und W). Die Cystatin-ähnliche Domäne zeigt hohe Homologien der Aminosäuresequenz zum Cystatin 1cew [Nägler *et al.*, 1999a]. Diese Domäne ist in soweit interessant, als dass Cystatine reversibel bindende Inhibitoren der lysosomalen Cystein-Proteasen sind und an der Regulation der proteolytischen Aktivität dieser Enzyme *in vivo* beteiligt sind. Auf genetischer Ebene zeigt sich, dass Ähnlichkeiten zwischen den genetischen Strukturen von Cystatinen und der Cystatin-ähnlichen Domäne von Kathepsin F bestehen. CTSF ist offensichtlich aus einer Fusion des angestammten Kathepsin F-Gens und einem Cystatin-Gen entstanden [Wex *et al.*, 1999b]. Möglicherweise reguliert die Cystatin-ähnliche Domäne die Aktivität anderer Enzyme oder alternativ die von Kathepsin F selbst. Die Aminosäuresequenz der Proregion von Kathepsin F ist in Abb. 4 und die des reifen Enzyms in Abb. 5 dargestellt.

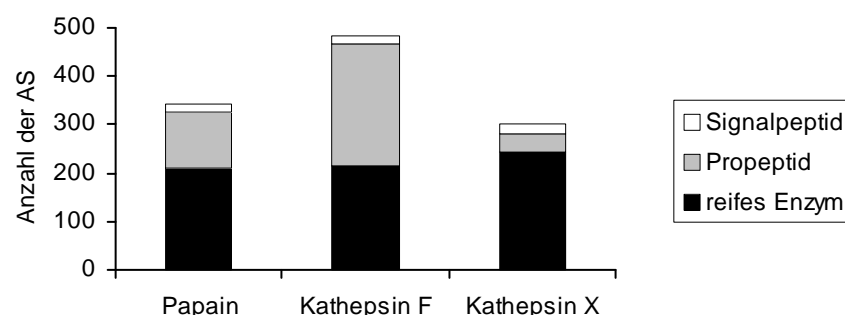


Abb. 3: Schematische Darstellung der Größe der Kathepsine F und X im Vergleich zu Papain [Turk *et al.*, 2001; MEROPS, 2003].

MAPWLQLLSL	LGLLPGAVAA	PAQPRAASFQ	AWGPPSPELL	APTRFALEMF	NRGRAAGTRA	60
VLGLVRGRVR	RAGQGSLSL	EATLEPPCN	DPMVCRLPVS	KTLLCSFQV	LDELGRHVLL	120
RKDCGPVDTK	VPGAGEPKSA	FTQGSAMISS	LSQNHDPNRN	ETFSSVISLL	NEDPLSQDLP	180
VKMASIFKNF	VITYNRTYES	KE E ARW R LSV	F VNN M VR A QK	I QALDRGTAQ	YGVTKFSDLT	240
EEEFRTIYLN	TLLRKEPGNK	MKQAKSVGDL				270

Abb. 4: Aminosäuresequenz der Proregion von Kathepsin F. Signalpeptid von M¹-A¹⁹, Propeptid von A²⁰-L²⁷⁰. Markierungen: Glykosilierungsstellen, Cystatin-Domäne, **ERF-NAQ**-Motiv [Nägler *et al.*, 1999a].

APPEWDWRSK	GAVTKVKDQG	MCGS C WAFSV	TGNVEGQWFL	NQGTLLSLSE	QELLDCKMD	60
KACMGLPSN	AYSAIKNLGG	LETEDDYSYQ	GHMQSCNFS	EKAKVYINDS	VELSQNEQKL	120
AAWLAKRGPI	SVAINAFGMQ	FYRHGISRPL	RPLCSPWLID	H AVLLVGYN	RSDVPFWAIK	180
N SWGTDWGEK	GYYYLHRGSG	ACGVNTMASS	AVVD			214

Abb. 5: Aminosäuresequenz des reifen Kathepsin F. Markierungen: Glykosilierungsstellen, **C²⁵H¹⁶¹N¹⁸¹** katalytisches Zentrum [Nägler *et al.*, 1999a; Santamaría *et al.*, 1999].

Vergleiche der Primärsequenzen der reifen Enzyme zeigen, dass Kathepsin F zu 34-42% mit den Kathepsinen H, K, L, O, S und W identisch ist. Eine geringere (26-32%), aber noch signifikante Übereinstimmung zeigt sich bei den Kathepsinen B, C und X. Ähnliches gilt auch für die Proregionen. Die C-terminale (Cystatin-ähnliche) Domäne von Kathepsin F zeigt in 13-20% Übereinstimmungen mit den Kathepsinen K, L und S. Deutlich höhere Übereinstimmung zeigt sich beim Vergleich mit Kathepsin W (39%), was wiederum darauf hindeutet, dass die Kathepsine F und W eine eigene Gruppe innerhalb der Cystein-Proteasen der Papain-Familie bilden [Nägler *et al.*, 1999a]. Die Aminosäuresequenz vom humanen Kathepsin F ist in 78% homolog zu der des murinen Kathepsin F [Shi *et al.*, 2000].

Kathepsin F besitzt Endopeptidasenaktivität [Turk *et al.*, 2001]. Die enzymatische Aktivität gegenüber bestimmten synthetischen Peptiden (Cumarine) ist etwas höher im Vergleich zu der von Kathepsin X. Kathepsin F kann, wie andere Cystein-Proteasen auch, durch E64 gehemmt werden [Santamaría *et al.*, 1999]. Kathepsin F wird in der katalytischen Aktivität gut durch Cystatin C inhibiert, wohingegen Kininogene das Enzym weniger stark hemmen. Im Unterschied zu anderen Endoproteasen wird Kathepsin F weniger stark durch Steffine inhibiert [Fonovic *et al.*, 2004]. Das pH-Optimum liegt im sauren Bereich [Wang *et al.*, 1998]. Die Deglykosylierung des Kathepsin F verringert die katalytische Aktivität. Dieses ist insofern interessant, als dass sich die Glykosilierungsstellen an der Oberfläche des Enzyms befinden und damit nicht in unmittelbarer Nähe zum katalytischen Zentrum [Ho *et al.*, 2002].

Vorkommen

Kathepsin F ist eine Cystein-Protease, welche ubiquitär im menschlichen Organismus gefunden wird. Via Northern-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass Kathepsin F in Herz, Gehirn, Skelettmuskel, Niere, Hoden, Ovarien, Kolon und Pankreas mittel bis stark exprimiert wird. Niedrigere Expressionslevel wurden in Plazenta, Lunge, Dünndarm, Milz und Leber gefunden. Im Thymus und in peripheren Leukozyten fand sich keine entsprechende RNA [Wang *et al.*, 1998; Nögler *et al.*, 1999a]. Im Unterschied zu anderen Kathepsinen konnte Kathepsin F-RNA im Gehirn in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Wang und Mitarbeiter konnten weiterhin im Northern-Blot zeigen, dass Kathepsin F auch in verschiedenen Tumorzelllinien vorhanden ist. So ergab sich für die Zelllinien HeLa S3 (Zervixkarzinom), G-361 (Melanom) und A549 (Lungenkarzinom) ein hoher Spiegel. In den K562-Zellen (Leukämie) wurde die RNA mit niedrigeren Spiegeln nachgewiesen. Kein Nachweis gelang für HL-60 (Leukämie), MOLT-4 (Leukämie), Raji (Burkitt-Lymphom) und SW480 (Kolorektalkarzinom) [Wang *et al.*, 1998]. Die Arbeitsgruppe um Santamaría fand ähnliche Ergebnisse [Santamaría *et al.*, 1999].

Funktionen

Über die Funktion von Kathepsin F ist bis dato noch nicht viel bekannt. Es wird darauf näher in der Diskussion eingegangen (siehe Abschnitt 4).

1.2.3 Kathepsin X (EC 3.4.18.1)

Nähere Charakterisierung

Das Gen CTSX, welches für Kathepsin X kodiert, befindet sich auf Chromosom 20 in der Region q13 [Santamaría *et al.*, 1998] und unterscheidet sich damit von anderen Cystein-Proteasen der Papain-Familie. CTSX kodiert ein Protein, das aus einem Signalpeptid mit 23 Aminosäureresten, einem Propeptid mit 38 Resten und einem reifen Enzym mit 303 Resten besteht (Abb. 3, 6 und 7) [Nögler & Ménard, 1998; Santamaría *et al.*, 1998]. Humanes, aus der Leber gereinigtes Kathepsin X hat eine Molekularmasse $M_r \approx 33.000$ [Klemenčič *et al.*, 2000]. Das Propeptid von Kathepsin X ist mit 38 Aminosäureresten das kürzeste unter den bekannten Kathepsinen. Als weitere Besonderheit beinhaltet das Propeptid eine aus den drei Aminosäuren RGD bestehende Integrin-Bindungsstelle. RGD-Motive dienen in Zelladhäsionsproteinen, wie z. B. Fibronectin, als Erkennungsstellen für die Oberflächenrezeptoren. RGD-Sequenzen sind auch in verschiedenen Serin-Proteasen nachweisbar (z. B. Faktor X, Thrombin), jedoch nicht in den Cystein-Proteasen der Papain-Familie. Die Proregion

enthält einen Cystein-Rest, der eine spezielle Rolle in der Regulation und/oder der katalytischen Aktivität spielen könnte, wie es z. B. bei den Kathepsinen B und H bekannt ist. Zwei weitere Insertionen sind bei Kathepsin X einzigartig: Drei Aminosäuren sind in einer hoch konservierten Region der Kathepsine eingeführt [Nägler & Ménard, 1998]. Diese als Minischleife (mini-loop) bezeichnete Kette trägt wesentlich zur katalytischen Aktivität von Kathepsin X bei [Nägler *et al.*, 1999b]. Eine weitere, 15 Aminosäurereste lange Peptidkette ist vergleichbar mit der Verschlusschleife (occluding loop) bei Kathepsin B, die essenziell für die Dipeptidylcarboxypeptidaseaktivität ist [Nägler & Ménard, 1998]. Später konnten Strukturanalysen zeigen, dass diese Insertion wohl kein Äquivalent zur Verschlusschleife von Kathepsin B ist. Die Insertion von Kathepsin X ist entfernt des katalytischen Zentrums an der Seite des Enzyms lokalisiert und hat wahrscheinlich eine Bedeutung in der Interaktion mit anderen Proteinen oder anderen Komponenten der Zelle [Sivaraman *et al.*, 2000].

Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen von Kathepsin X mit den Kathepsinen B, C, K, L, S, W und Papain wurden Gemeinsamkeiten in 26-32% festgestellt [Nägler & Ménard, 1998]. Das menschliche Kathepsin X ist im Vergleich der Aminosäuresequenz in 79-84% identisch mit dem Kathepsin X der Maus [Deussing *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2000].

Das Enzym beinhaltet zwei potenzielle N-Glykosilierungsstellen [Nägler & Ménard, 1998; Santamaría *et al.*, 1998]. Das Vorhandensein einer Signalsequenz und der Glykosilierungsstellen suggerieren, dass auch Kathepsin X via Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Weg in das endosomal/lysosomale Kompartiment gelangt.

Kathepsin X ist das erste Beispiel für ein Enzym, bei dem die Inhibition der proteolytischen Aktivität des Enzyms erreicht wird, indem die Proregion reversibel kovalent an das aktive Zentrum bindet [Sivaraman *et al.*, 2000].

Kathepsin X besitzt Exopeptidasenaktivität (C-terminal). Nicht ganz klar war in der Vergangenheit, ob Mono- oder Dipeptide abgespalten werden [Nägler *et al.*, 1999b; Klemenčič *et al.*, 2000]. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass es sich bei Kathepsin X um eine Carboxymonopeptidase handelt [Puzer *et al.*, 2005]. Kathepsin X besitzt, wenn überhaupt, nur sehr geringe Endopeptidasenaktivität [Nägler *et al.*, 1999b; Klemenčič *et al.*, 2000]. Die Substratspezifität von Kathepsin X ist breit und überlappt sich mit anderen Kathepsinen. Das Besondere von Kathepsin X scheint die Kombination der einzigartigen Struktur und einer Co-Lokalisation von Enzym und Substrat in einer speziellen Umgebung der Zelle zu sein [Devanathan *et al.*, 2005]. Das pH-Optimum liegt bei 5,0 und der pI bei 5,1-5,3. Im alkalischen Bereich ist Kathepsin X sehr instabil. Eine spezifische Inhibition erfolgt durch E64 [Kirschke & Barrett, 1987; Santamaría *et al.*, 1998; Nägler *et al.*, 1999b; Klemenčič *et al.*, 2000]. Im Gegensatz zu

den meisten anderen Kathepsinen findet bei Pro-Kathepsin X keine autokatalytische Aktivierung *in vitro* statt, weder bei niedrigem pH (4,0 oder 5,0), Zusatz von DTT oder Erhöhung der Temperatur von 30 auf 60 °C. Lediglich der Zusatz von Kathepsin L führte zur Aktivierung von Kathepsin X [Nägler *et al.*, 1999b]. Im Gegensatz zu Kathepsin L kann Kathepsin X nur bei einer sehr hohen Konzentration von Cystatin C in seiner Aktivität inhibiert werden [Nägler *et al.*, 1999b]. Bemerkenswert ist jedoch, dass nicht-rekombinantes, gereinigtes Kathepsin X doch von Cystatin C inhibiert werden kann. Möglicherweise trägt die starke Glykosylierung von rekombinantem Kathepsin dazu bei [Klemenčič *et al.*, 2000].

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Kathepsin X tatsächlich in Lysosomen lokalisiert ist [Nascimento *et al.*, 2005]. *In vitro* scheint Heparin Kathepsin X zu beeinflussen: Die Bindung von Heparin bedingt eine Konformationsänderung des Enzyms, was zu einer 4-fach höheren Dissoziationskonstante der Enzym/Substrat-Interaktion sowie zu einer 2,6-fach höheren katalytischen Aktivität führt. Weiterhin kann Kathepsin X an Heparansulfatproteoglykane, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind, binden. Per Endozytose kann so Kathepsin X in die Zelle aufgenommen werden. Über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor kann so internalisiertes Kathepsin X wieder in die Lysosomen gelangen. Heparansulfatproteoglykane können also die enzymatische Aktivität sowie den zellulären „Handel“ von Kathepsin X regulieren [Nascimento *et al.*, 2005].

MARRGPGWRP LLLLVLLAGA AQGGLYFRRG QTCYRPLRGD GLAPLGRSTY PRPHEYLSPA D 61

Abb. 6: Aminosäuresequenz der Proregion von Kathepsin X. Signalpeptid von M¹-G²³, Propeptid von G²⁴-D⁶¹. Markierung: RGD-Motiv [Nägler & Ménard, 1998].

LPKSWDWRNV DGVNYASITR NQHIPPQYCGS CWAHASTSAM ADRINIKRKG AWPSTLLSVQ 60
 NVIDCGNRGS CEGGNDLSVW DYAHQHGIPD ETCNNYQAKD QECDKFNQCG TCNEFKECHA 120
 IRNYTLWRVG DYGSLSGREK MMAEIIYANGP ISCGIMATER LANYTGGIYA EYQDTTYINH 180
 VVSVAGWGIS DGTEYWIVRN SWGEPWGERG WLRIVTSTYK DGKGARYNLA IEEHCTFGDP 240
 IV 242

Abb. 7: Aminosäuresequenz des reifen Kathepsin X. Markierungen: Glykosylierungsstellen, Q²⁶C³¹H¹⁸⁰N²⁰⁰ katalytisches Zentrums [Nägler & Ménard, 1998; Santamaría *et al.*, 1998].

Vorkommen

Kathepsin X kommt in den meisten menschlichen Geweben vor. Via Northern-Blot-Analysen konnten die beiden Arbeitsgruppen um Nägler und um Santamaría

zeigen, dass Kathepsin X mittel bis stark in Plazenta, Lunge, Leber, Niere, Pankreas, Kolon, Ovar, Leukozyten, Prostata, Dünndarm und Milz angereichert ist. In Herz, Gehirn, Skelettmuskel, Hoden und Thymus ist es dagegen weniger nachweisbar [Nägler & Ménard, 1998; Santamaría *et al.*, 1998]. Ebenso wie Kathepsin F kann Kathepsin X auch in verschiedenen Tumorzelllinien (HL-60, HeLa S3, K-562, MOLT-4, Raji, SW480, A549, G361; siehe auch Abschnitt 1.2.2) und Primärtumoren (Niere, Blase, Prostata, Magen, Lunge, Kolon) nachgewiesen werden [Santamaría *et al.*, 1998].

Funktionen

Die möglichen Funktionen von Kathepsin X werden im Abschnitt 4 diskutiert.

1.3 Fragestellung

Zielstellung der hier vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob bzw. inwieweit die erst kürzlich näher beschriebenen Kathepsine F und X in gesunden Geweben sowie in Malignomen eine Rolle spielen. Zum Zeitpunkt der Konzeption der Studie waren die beiden Enzyme biochemisch hinreichend charakterisiert. Es gab jedoch nur wenige Arbeiten in denen beschrieben wurde, in welchen Organen bzw. Organsystemen die beiden Kathepsine vorkommen. Des Weiteren war noch nicht ausreichend untersucht, ob diese Kathepsine auch bei Tumoren eine Rolle spielen, wie es für einige andere Kathepsine bereits bekannt war. Die wenigen vorhandenen Daten basierten auf Analysen auf mRNA-Ebene. Immunhistochemische Arbeiten fehlten gänzlich.

Diese Arbeit könnte eine Grundlage für zukünftige Untersuchungen darstellen. Es sollte durch immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Kathepsin F und X versucht werden zu klären, in welchen Organen bzw. Organsystemen die Kathepsine F und X vorkommen und ob sie in malignen Geweben vermehrt exprimiert werden. Es ergaben sich daher folgende Arbeitsziele:

- Werden die Kathepsine F und X in gesunden Geweben exprimiert?
- Sind die beiden Kathepsine in malignen Geweben vermehrt nachweisbar?
Wenn ja, sind sie sowohl in epithelialen als auch in mesenchymalen malignen Tumoren exprimiert?

- Besteht eine Korrelation zwischen Expressions- und dem Malignitätsgrad?
- Gibt es in den gesunden Geweben eine Abhängigkeit der Expression vom Alter der Patienten?
- Sind histologische Besonderheiten bei der Expression der beiden Kathepsine nachweisbar?
- Lassen sich die Daten verschiedener Methoden (Immunhistochemie und Western Blot) miteinander vergleichen?
- Können anhand der hier gewonnen Daten und der aktuellen Literatur nähere Funktionen für Kathepsin F und X beschreiben werden?

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Untersuchungsmaterial

Für die immunhistochemische Analyse dieser Arbeit wurden Präparate von epithelialen und mesenchymalen malignen Tumoren verwendet (Tab. im Anhang). Einer epithelialen Neoplasie wurden 61 Fälle (73,5%) und einer mesenchymalen Neoplasie 22 Fälle (26,5%) zugeordnet. In die Sammlung wurden auch zwei Basaliome (syn. Basalzellkarzinom), die zu den sog. semimalignen epithelialen Tumoren zählen eingebracht. Diesen Tumoren ist gemeinsam, dass sie infiltrativ und destruierend wachsen, jedoch nicht metastasieren sollen [Böcker *et al.*, 1997]. In der Literatur sind allerdings auch metastasierende Basaliome beschrieben [Snow *et al.*, 1994; Mulayim *et al.*, 2002]. Die hier verwendeten 83 Präparate stammen alle aus der klinischen Routinediagnostik aus den Jahren 1993-1999 des Institutes für Pathologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Direktor: Prof. Dr. med. A. Roessner). Für die Auswahl wurde die Befunddatenbank des Institutes gezielt durchgesehen. Die pathologische Diagnose sollte eindeutig sein. Gesucht wurde nach verschiedenen Malignitätsgraden einer Tumorentität. Nach Möglichkeit sollte auf einem Objektträger sowohl Tumor- als auch das entsprechende Normalgewebe vorhanden sein. Auf die Verwendung von Prostatakarzinomen wurde bewusst verzichtet, da dieses Thema speziell durch eine andere Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie ausführlich bearbeitet wurde [Nägler *et al.*, 2004]. Die in die Sammlung eingegangenen Fälle stammten von 48 männlichen (58%) und 35 weiblichen (42%) Patienten. Das mittlere Alter betrug 62 Jahre (Spannbreite 21-87 Jahre). Dabei waren mehr als zwei Drittel der Patienten 60 Jahre und älter (Abb. 8). Von den 83 Fällen konnten 13 (15,7%) einem niedrigen (G1), 32 (38,5%) einem mittleren (G2) und 22 (26,5%) einem hohen (G3) Malignitätsgrad zugeordnet werden. Bei 16 Fällen (19,3%) erfolgte keine Zuordnung, da es sich entweder nur um Normalgewebe handelte oder ein Grading bei der entsprechenden Tumorentität nicht üblich ist (z. B. beim Schilddrüsenkarzinom).

Für die Western Blots wurden acht Karzinome aus dem Jahr 2001 ausgewählt (Tab. 4). Dabei handelt es sich um frisches Operationsmaterial aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Direktor: Prof. Dr. med. H. Lippert). Es wurde jeweils neoplastisches Gewebe sowie das dazugehörige gesunde Gewebe untersucht.

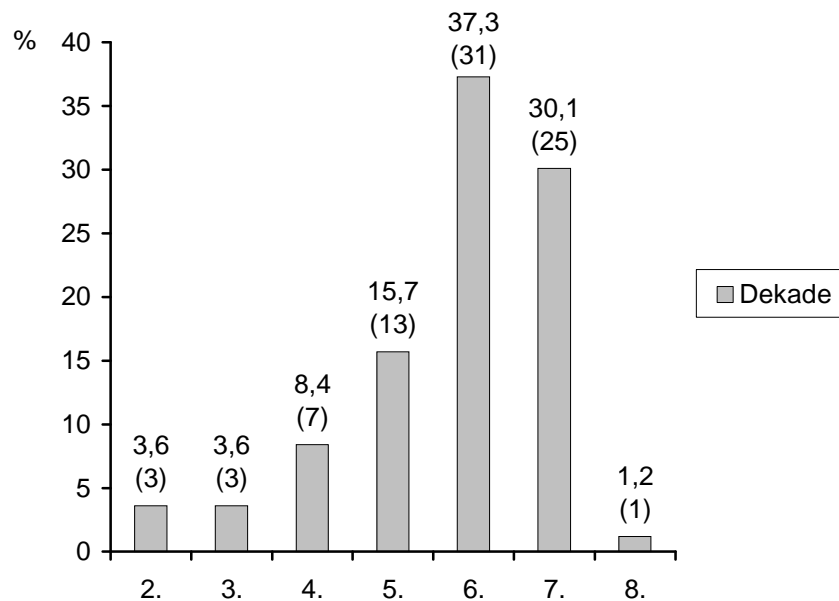


Abb. 8: Altersverteilung je Dekade. Angabe in Prozent. In Klammern Anzahl n.

#	Organ	Diagnose
1	Pankreas	Adenokarzinom
2	Kolon	Adenokarzinom
3	Kolon	Adenokarzinom
4	Pankreas	Adenokarzinom
5	Leber	Cholangiozelluläres Karzinom
6	Leber	Hepatozelluläres Karzinom
7	Ösophagus	Plattenepithelkarzinom
8	Leber	Hepatozelluläres Karzinom

Tab. 4: Frischmaterial für den Western Blot. Die laufende Nummer (#) entspricht der Anordnung in der Abb. 13 bzw. 14 (Abschnitt 3.2).

2.2 Kathepsin F und X sowie die entsprechenden Antikörper

Kathepsin F und X sowie die entsprechenden Antikörper wurden freundlicherweise von Frau Dr. rer. biol. hum. D. Nögler (ehemalige wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pathologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) zur Verfügung gestellt.

Polyklonale Antikörper gegen humanes Kathepsin F wurden durch Immunisierung eines Kaninchens mit dem vom Kathepsin F abgeleiteten synthetischen Peptid QGHMQSCNFSAEKAK hergestellt. Dieses Peptid entspricht einer Region, welche innerhalb der Cystein-Proteasen der Papain-Familie nicht gut konserviert ist. Eine

Kreuzreaktion mit anderen Proteasen der Familie ist daher unwahrscheinlich [Daten nicht gezeigt; Nägler *et al.*, 2004].

Polyklonale Antikörper gegen humanes Pro-Kathepsin X wurden durch Immunisierung eines Kaninchens mit rekombinantem humanen Pro-Kathepsin X hergestellt [Nägler *et al.*, 1999b; Nägler *et al.*, 2004]. Die IgG-Fraktion, die den Kathepsin X-Antikörper enthielt, wurde durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von immobilisiertem Pro-Kathepsin X weiter gereinigt [Daten nicht gezeigt; Nägler *et al.*, 2004].

Kreuzreaktionen beider Antikörper mit Kathepsin B und L wurden mittels Western Blot getestet [Daten nicht gezeigt; Nägler *et al.*, 2004].

2.3. Immunhistochemie

Avidin-Biotin-Methode

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde die Avidin-Biotin-Methode - eine immunenzymatische Technik - angewandt. Bei dem hier verwendeten indirekten Verfahren bindet ein Sekundärantikörper an einen Primärantikörper, der das entsprechende Antigen im Gewebe detektieren soll. Die Avidin-Biotin-Methode beruht auf der sehr hohen Bindungsaffinität des im Hühnereiweiß gefundenen Glykoproteins Avidin zu Biotin (Vitamin H). Gelegentlich kommt es bei Verwendung von Avidin zu unspezifischen Reaktionen. Daher ist es zweckmäßig, ein reineres, auf gentechnischem Wege gewonnenes Avidin zu verwenden (z. B. Streptavidin aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*). Ein Molekül Avidin vermag vier Moleküle Biotin zu binden. Der sekundäre Antikörper wurde kovalent biotinyliert. Bis zu 150 Moleküle Biotin können an einen Antikörper gekoppelt werden. An diesen können nun mehrere enzymmarkierte Avidin-Moleküle bzw. präformierte Avidin-Biotin-Enzym-Komplexe (ABC) binden. Letztere bilden auch untereinander vernetzte Verbindungen. Zusammen trägt dieses zur verbesserten Sensitivität durch Erhöhung der Enzymkonzentration am Ort des Nachweises bei. Als Enzym verwendet man in der Regel Peroxidase oder alkalische Phosphatase. Die Enzyme setzen ein farbloses Chromogen in ein farbiges Produkt um, das dann präzipitiert. In dieser Arbeit fand die ABC-Methode Verwendung. Als Enzym wurde die alkalische Phosphatase, die aus Neufuchsin einen roten Farbstoff bildet, eingesetzt. Vorteile der hier verwendeten ABC-Methode sind die hohe Sensitivität und auch Wirtschaftlichkeit gegenüber anderen etablierten Verfahren wie der Peroxidase-anti-Peroxidase- oder der Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase-Methode. Die alkalische Phosphatase und Biotin kommen auch endogen

im Gewebe vor. So findet man die alkalische Phosphatase verstärkt in Dünndarm-epithel, Knochen, Nierentubuli, Leber, neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen, Epithelzellen der Harnblase und Trophoblasten der Plazenta. Biotin ist in Leber, Mamma, Gehirn, Nierentubuli, Pankreas, Schilddrüsenepithel und Leydig-Zwischenzellen vermehrt vorhanden. Daher müssen falsch positive Reaktionen durch Blockade dieser endogenen „Störenfriede“ verhindert werden. Die alkalische Phosphatase lässt sich vollständig durch Hitzedemaskierung zerstören. Weiterhin ist eine Inhibition des Enzyms durch den Zusatz von Levamisol zur Substratlösung möglich. Das endogene Biotin lässt sich durch eine Inkubation der Schnitte in Hühnereiweiß und Biotin blocken. Kommerziell erwerbbare Blockierungskits sind dafür vorhanden. Auch Avidin ist verantwortlich für falsch positive Reaktionen: Avidin (nicht Streptavidin) führt bei neutralem pH-Wert durch Bindung an negativ geladene Zellstrukturen (Zellkerne, Membranen) ebenfalls zu unspezifischen Hintergrundfärbungen. Verhindert werden kann dieses durch die Anhebung des pH-Wertes ins alkalische Milieu, womit auch die unspezifische Bindung des Avidins an Mastzellgranula geblockt wäre. Ein weiterer Nachteil der ABC-Methode ist die fehlende Signalverstärkung durch Wiederholungen der Prozedur der Immunfärbung. Durch die Verwendung von Puffer- und Spüllösungen werden unterschiedliche Ladungen im Gewebe, an die die Antikörper unspezifisch binden, abgesättigt. Dazu dienen Serumalbumin, Tris-Lösungen, Puffer mit hoher Ionenstärke/Salzkonzentration, ein alkalischer pH oder Triton (Detergenz) [Hsu *et al.*, 1981; Denk, 1989; Belling *et al.*, 1999; Noll & Schaub-Kuhnen, 2000].

Materialien für die Immunhistochemie

Die verwendeten Chemikalien für die Durchführung der Immunhistochemie sind hier aufgeführt:

Tris-Puffer:	9 g Tris (Fluka, Neu-Ulm) 68,5 g Tris-HCl (Serva, Heidelberg) 87,5 g NaCl (Roth, Karlsruhe) in 1000 ml Aqua dest., auf 1:10 verdünnen und 3-4 Tropfen Triton X-100 (Fluka) zugeben
RPMI-Lösung:	5 ml RPMI (Bio-Whittacker, Heidelberg) 50 ml Aqua dest. 5 ml BSA (GIBCO, Eggenstein) 0,05 g Na-azid (Sigma, Deisenhofen) pH=7,4-7,6
Stammlösung A:	10,5 g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol (Merck) in 500 ml Aqua dest.

Stammlösung B:	6,1 g Tris 37 ml 1 N HCl 12 g NaCl 700 mg Levamisol (Fluka) in 1000 ml Aqua dest.
Farblösung:	26 ml Stammlösung A 72 ml Stammlösung B 20 mg Na-Nitrit 500 µl Aqua dest. 200 µl Neufuchsin (Merck) 40 mg Naphthol-AS-Bi-Phosphat (Sigma) 600 µl Dimethylformamid (Laborchemie, Apolda) mit 2 N HCl auf pH=8,74 einstellen; ergibt 100 ml für 30 Schnitte.

Durchführung der Immunhistochemie

Die entsprechenden Paraffinblöcke wurden mit dem Mikrotom geschnitten (3 µm), auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht im Ofen bei >60 °C getrocknet. Danach wurden die Gewebeschnitte in Xylol (3 x 5 min) und einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100%, 2 x 96%, 1 x 75%, danach Spülen mit Aqua dest.) bei Raumtemperatur entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte mit Tris-Puffer gespült. Nun erfolgte die Blockung. Dabei wurden die Schnitte mit Ultra Tech HRP Kit Protein Blocking Agent (Immunotech, Marseille, Frankreich) betropft, bei Raumtemperatur 20 min in eine feuchte Kammer gestellt und der Überschuss dann abgeschüttelt.

Für die Detektion der Kathepsine F und X im Gewebe wurde jeweils ein polyclonaler Kaninchen-anti-Kathepsin-Antikörper verwendet. Der Kathepsin F-Antikörper wurde 1:100 und der Kathepsin X-Antikörper 1:400 verdünnt. Dazu diente, wie auch für weitere Verdünnungen, RPMI-Lösung. Ein vorbereiteter Schnitt wurde mit 100 µl der jeweiligen Antikörperverschüttung benetzt, über Nacht (Kathepsin F 20 Stunden, Kathepsin X 18 Stunden) bei 4 °C inkubiert und mit Tris-Puffer anschließend mehrfach gespült.

Die Immunreaktionen wurden mittels der oben beschriebenen ABC-Methode (alkalische Phosphatase) sichtbar gemacht. Dazu wurde der Vectastain ABC-AP Kit nach Anweisungen des Herstellers verwendet (1:100; CAMON, Wiesbaden).

Für den sekundären Brückenantikörper wurde ein biotinylierter Maus-anti-Kaninchen-Antikörper (1:200; Immunotech, Marseille, Frankreich) benutzt. Dieser inkubierte 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nach mehrmaligem Spülen in Tris-Puffer wurde der Avidin-Biotin-Enzym-Komplex ebenfalls 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, der Schnitt dann wieder mehrfach mit Tris-Puffer gespült. Die Schnitte wurden anschließend für 25 min auf dem Schüttler gefärbt und dann unter fließendem Wasser gründlich gespült. Zum Entgasen kamen die

Schnitte über Nacht in Wasser in den Kühlschrank. Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (Hämalaun) für eine Minute. Vor dem Eindecken mit Glycerin-Gelatine wurden die Schnitte wiederum mit Aqua dest. gespült.

Zur Testung der Spezifität der Immunfärbungen diente als Positivkontrolle embryonales Bein und Niere für Kathepsin F bzw. X. Die Negativkontrollen erfolgten durch Weglassen der Primärantikörper.

2.4 Westen Blot

Bevor der Western Blot durchgeführt werden konnte, mussten die Proteine aus dem Frischgewebe extrahiert und deren Gehalt bestimmt werden. Anschließend wurde das Proteingemisch per Gelelektrophorese aufgetrennt. Danach konnte der spezifische Nachweis von Kathepsin F und X via Western Blot erfolgen.

Methode der Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte spektrophotometrisch nach der Methode von Lowry [Lowry *et al.*, 1951]. Die Proteine reagieren mit Kupfer-tartrat im alkalischen Milieu. Später erfolgt die Reduktion des Folin-Reagens durch die Kupfer-behandelten Proteine. Die Proteine reduzieren das Folin-Reagens durch Verlust von ein bis drei Sauerstoffatomen. Dadurch kommt es zu einer oder mehreren reduzierten Verbindungen, die ein charakteristisches blaues Licht aussenden. Dieses Licht hat ein Absorptionsmaximum bei 750 nm. Die gemessene Absorption ist dabei proportional zur Proteinkonzentration des Standardgemisches.

Wenn die Konzentration der Proteine bestimmt wurde, kann für die Gelelektrophorese die gleiche Menge an Protein der verschiedenen Proben verwendet werden. Die Ergebnisse werden somit vergleichbar.

Methode der Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden Proteine in einem Proteingemisch unter Einfluss eines elektrischen Feldes durch ein Gel getrennt, d. h. geordnet. Je nach Größe und Ladung der Proteine bewegen sich diese unterschiedlich schnell durch das als Sieb wirkende Gel. Das z. B. aus polymerisierten Acrylamid bestehende Gel bildet ein engmaschiges Netzwerk, das die zu trennenden Proteine bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld behindert. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine vor der Auftrennung im Gel durch Inkubation mit dem Detergens SDS denaturiert. Dieses hat zwei wichtige Vorteile gegenüber der nativen PAGE: Nicht-kovalente Proteinaggregate

werden aufgelöst, die Proteine bewegen sich im Gel annähernd proportional zu ihrer Größe. Da SDS negativ geladen ist, wird die Eigenladung des Proteins i. d. R. vernachlässigbar und das Verhältnis von Ladung zu Größe ist für jedes Protein annähernd gleich [Lehninger *et al.*, 1998]. Die am häufigsten verwendete Elektrophoresemethode ist das SDS-PAGE-System nach Laemmli, welches in der hier vorliegenden Arbeit verwendet wurde [Laemmli, 1970]. Es handelt sich um ein diskontinuierliches System aus zwei Gelen, einem Trenngel (unten in der Anordnung) und einem Sammelgel (oben), die sich beide im Hinblick auf den pH, die Ionenstärke und die Porengröße unterscheiden. Die Proben werden im Sammelgel zunächst konzentriert, bevor sie im Trenngel aufgetrennt werden. Dieses führt zu schärferen Banden und erlaubt größere Probenvolumina als in Gelen ohne Sammelgel.

Methode des Western Blot

Beim Western Blot (syn. Immunoblot) werden zuvor aufgetrennte Proteine aus einer Matrix (z. B. Polyacrylamidgel) über ein dazu senkrecht angelegtes elektrisches Feld auf eine Trägermembran (z. B. Nitrozellulose) transferiert [Towbin *et al.*, 1979]. An der Membran bleiben die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten, und das an die Proteine gebundene SDS wird ausgewaschen. Die Proteine können dabei renaturieren und teilweise ihre Sekundär- oder Tertiärstruktur wieder annehmen. Die Identität der Proteine auf der Membran kann nun mit Hilfe einer Immundetektion bestimmt werden. Dabei bindet ein antigenspezifischer primärer Antikörper an Epitope des gesuchten Proteins, nachdem freie Bindungsstellen auf der Membran blockiert wurden. An den Primärantikörper wird nun ein sekundärer gebunden, über den die Detektion erfolgt. Ein Vorteil der zweistufigen Detektion ist, dass die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an den primären zu einer Signalverstärkung führt. In der hier vorliegenden Arbeit ist eine Peroxidase an den sekundären Antikörper gebunden, die die Umsetzung von Luminol in die oxidierte Form katalysiert. Durch diese Chemilumineszenz kann ein photographischer Film belichtet werden. Mittels Filmentwicklung kann dann das Proteinsignal visualisiert werden [Lehninger *et al.*, 1998].

Materialien für die Proteinextraktion, SDS-PAGE und den Western Blot

Die verwendeten Chemikalien für die Durchführung der Proteinextraktion, SDS-PAGE und des Western Blot sind hier aufgeführt:

Lysispuffer:	4 M Harnstoff (Merck, Darmstadt) 0,5% SDS (Sigma, Steinheim) 62,5 mM Tris (Sigma, Steinheim) pH=6,8 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (Calbiochem, Bad Soden) 100 µM E64 (Bachem, Heidelberg)
Probenpuffer:	62,5 mM Tris-HCl (3,78 g) pH=6,8 10% SDS (5 g) 50% Glyzerin (25 ml) (GibcoBRL, Paisley, UK) 25% DTT (Sigma) Bromphenolblau (Spatelspitze) für 50 ml
Trenngel:	3,52 ml Aqua dest. 4,34 ml Acrylamid (Roth, Karlsruhe) 2 ml Puffer (1,875 M Tris, 1% SDS, pH=8,8) 75 µl APS 10% (Sigma) 8 µl TEMED (Sigma)
Sammelgel:	6,33 ml Aqua dest. 1,65 ml Acrylamid 2 ml Puffer (1,875 M Tris, 0,5% SDS, pH=6,8) 150 µl APS 10% 8 µl TEMED
Elektrodenpuffer:	0,25 M Tris-HCl (30,28 g) 1,92 M Glycin (144 g) (INC Biomedicals, Aurora, USA) 1% SDS (10 g) pH=8,3 für 600 ml
Blotting-Puffer:	25 mM Tris-HCl (3,28 g) 192 mM Glycin (14,4 g) 20% Methanol (200 ml) (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) pH=8,3 für 1000 ml
Blockierung:	TBS (100 ml) 3% BSA 0,05% Tween (Sigma)
TBST	TBS 0,05% Tween

Durchführung der Proteinextraktion, Konzentrationsbestimmung, SDS-PAGE und des Western Blot

Zuerst erfolgte die Proteinextraktion aus dem Frischmaterial. Das gefrorene Gewebe (50-200 mg) wurde zunächst im Lysispuffer homogenisiert (IKA Labortechnik, Berlin) und dann mit Ultraschall behandelt (Sonicator, Bandelin, Berlin). Danach wurde das Homogenisat für 10 min bei 4 °C bei 14.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf,

Hamburg). Dem Überstand wurde Probenpuffer (reduzierte Bedingungen durch Zusatz von DTT) hinzugefügt und anschließend für 5 min bei 98 °C gekocht. Die Proben wurden dann bei minus 20 °C gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem DC Protein Assay nach den Angaben des Herstellers (Bio-Rad, Hercules, USA). Dafür wurden je 5 µl einer Standardverdünnungsreihe (enthält BSA und Aqua dest.) und 5 µl der Probe jeweils als Doppelbestimmung in eine 96-Lochplatte pipettiert. Danach wurden 20 µl Reagens S (enthält 5 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ in 1 l Natriumtartrat) in 1 ml Reagens A (2 g Na_2CO_3 in 100 ml 0,1 M NaOH) gelöst. Von diesem Gemisch wurden jeweils 25 µl zu den vorbereiteten Proben und Standards gegeben. Nach Zugabe von 200 µl Reagens B (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagens, enthält Natriumwolframat und Natriummolybdat) wurde die Lochplatte 15 min inkubiert. Der Ansatz wurde dann im Bio-Rad ELISA Reader eingelesen und die Ergebnisse ausgedruckt.

Für die Gelelektrophorese wurde die Elektrophoresekammer Power Pac 200 verwendet (Bio-Rad). Zwischen die in einer Halterung befestigten Glasplatten wurde zu zwei Dritteln das 13%ige Trenn- und nach Polymerisation das 5%ige Sammelgel eingefüllt. In letzteres wurde ein Kamm zum Aussparen der Probentaschen eingesetzt. Das Gel wurde dann in die Kammer eingespannt und der Elektrodenpuffer eingefüllt. Die erste Tasche wurde mit dem Marker für die Molekularmasse beladen (BenchMark Prestained Protein Ladder, GibcoBRL, Eggenstein). Die Tasche 2 wurde mit den Kontrollen (Kathepsin F bzw. Pro-Kathepsin X) und die Taschen 3 bis 10 mit den Proteingemischen (jeweils Normal und Tumorgewebe von einem Patienten im Wechsel) beladen. Die reinen Kathepsine bzw. die Proteingemische wurden je nach Konzentration mit dem Probenpuffer auf 25 µl aufgefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 140 V für 60 min durchgeführt.

Für den Western Blot wurde ebenfalls die Apparatur von Bio-Rad verwendet. Zunächst wurde der Blot als Sandwich zusammengebaut. Dazu wurden ein Gitter, Fiberpad, Filterpapier, Gel, Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel), Filterpapier, Fiberpad und wieder ein Gitter in dieser Reihenfolge verwendet. Das Blotting erfolgte bei 100 V für 60 min. Der Blot wurde dann blockiert und anschließend in TBS gewaschen. Nun erfolgte bei Raumtemperatur für 60 min die Inkubation mit dem primären Antikörper in Blockierungslösung (Kathepsin F 1:200, Pro-Kathepsin X 1:1.000). Danach wurde der Blot mit Aqua dest. und TBST gewaschen. Der sekundäre, mit Peroxidase konjugierte Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (ImmunoPure, Pierce,

Rockford, USA) wurde wie folgt hergestellt: Lösen in Aqua dest., Zugabe von Glycerol, Lagerung bei -20 °C. Die Inkubation mit dem Sekundä rantikörper (1:50.000) erfolgte in TBST für 40 min. Der Blot wurde wiederum mit Aqua dest. und TBST gewaschen. Die Substratlösung (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) wurde im Verhältnis 1:1 hergestellt (Peroxid- und Luminollösung). Diese wurde für 5 min auf den Blot gegeben. Danach wurde der Blot in Folie eingeschweißt und in eine Kassette gelegt. In einer Dunkelkammer wurde ein Photofilm (BioMax MR-1, Sigma) mit dem Blot belichtet. Der Film wurde nun in der Klinik für Diagnostische Radiologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (damaliger Direktor: Prof. Dr. med. W. Döhring), in einer Entwicklungsmaschine (Curix 402, Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien) entwickelt.

2.5 Auswertung

Mikroskopie

Die mit Antikörper gegen Kathepsin F und X gefärbten Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop beurteilt. Dabei spielte nur das Tumorparenchym (Zellen) sowie das entsprechende gesunde Parenchym (Zellen) eine Rolle; Stromagewebe blieb also unberücksichtigt.

Zur Beurteilung der Immunreaktivität wurde ein Punktesystem verwendet, welches sowohl die Intensität der Färbung als auch die Anzahl der positiven Zellen berücksichtigt (nach Nägler *et al.*, 2004). Die Intensität (I) der Antikörperfärbungen wurde in vier Grade eingeteilt: keine (I₀), schwach (I₁), mittelgradig (I₂) und stark positiv (I₃). Dafür wurde das gesamte auf dem Schnitt verfügbare Tumor- bzw. entsprechende Nicht-Tumorgewebe beurteilt. Der Anteil der vier verschiedenen Grade der Färbintensität im vorhandenen Material wurde geschätzt. Der entsprechende Anteil wurde gewichtet und so für eine schwache Färbung mit eins, für mittelgradig mit zwei und für stark positiv mit drei multipliziert. Nicht gefärbte Anteile wurden gleich null gesetzt. Die daraus resultierenden Werte wurde addiert und durch 100 dividiert. Der Quotient ergab den Immunreaktivitätswert IRW für Kathepsin F und X bezogen auf einen Fall. Die Formel lautet:

$$\text{IRW} = \frac{(\text{Anzahl [\%]} I_0 \cdot 0) + (\text{Anzahl [\%]} I_1 \cdot 1) + (\text{Anzahl [\%]} I_2 \cdot 2) + (\text{Anzahl [\%]} I_3 \cdot 3)}{100}$$

Möglich sind also Werte für IRW von 0 bis 3,0. Die Punktwerte wurden in einer Tabelle zusammengestellt. Zur besseren Anschauung in dieser Tabelle wurde jedem

IRW ein Symbol (0 bis +++) zugeordnet, wobei 0 keiner, + einer schwachen, ++ einer mittelgradigen und +++ einer starken Positivität für die entsprechende Antikörperfärbung entspricht (siehe auch Tab. 5). Die statistischen Berechnungen wurden mit den Werten als solche durchgeführt.

IRW	Grad der Positivität
$0,0 \leq \text{IRW} \leq 0,4$	0 Negativ
$0,5 \leq \text{IRW} \leq 1,4$	+ Schwach positiv
$1,5 \leq \text{IRW} \leq 2,4$	++ Mittelgradig positiv
$2,5 \leq \text{IRW} \leq 3,0$	+++ Stark positiv

Tab. 5: Immunreaktivitätswert (IRW) und die entsprechende Graduierung der Positivität der Antikörperfärbungen.

Beispiel: In einem Gewebe färben sich 10% der Zellen für ein Kathepsin nicht (I_0), 30% schwach (I_1), 40% mittelgradig (I_2) und 20% stark positiv (I_3) an. Nach der angegebenen Formel ergibt sich ein IRW von 1,4 - dieser entspricht einer schwach positiven Färbung (+), bezogen auf das gesamte betrachtete Gewebe.

Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Analyse-Funktionen des Computerprogramms Microsoft Excel 97 (Microsoft Corporation, 1997) durchgeführt. Es wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der IRWs berechnet. Zur Prüfung auf Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte der IRWs wurde der Student's-*t*-Test verwendet. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit α von 0,05 bei zweiseitiger Alternative angenommen. Statistische Signifikanz war bei Werten der Überschreitungswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ gegeben. Für Werte $p > 0,05$ und $p < 0,09$ wurde festgelegt, dass eine gewisse Tendenz in Richtung Signifikanz vorliegt.

Fotodokumentation

Exemplarisch wurden einige immunhistochemische Fälle digital fotografiert, elektronisch gespeichert und später für die Arbeit ausgedruckt. Die Western Blots wurden mit einem Flachbrettscanner eingelesen. Es wurden jeweils zwei Blots (acht Proben pro Blot, aufgeteilt in Normal- und Tumorgewebe) elektronisch zusammengeführt und dann ausgedruckt.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemie

Die Rohdaten der Immunhistochemie sind in der Anlage zusammengestellt.

Vergleich von Normal- und Tumorgeweben

Der IRW für Kathepsin F beträgt 0,07 für Normalgewebe und 0,14 für Tumorgewebe. Damit färbt sich Kathepsin F in beiden Gewebearten nicht an ($IRW < 0,4$). Ein signifikanter Unterschied zwischen Normal- und Tumorgeweben besteht nicht (Tab. 6).

Kathepsin X färbt sich in den beiden Gewebearten schwach an ($IRW = 0,70$ vs. $IRW = 0,83$). Ein signifikanter Unterschied lässt sich jedoch nicht feststellen (Tab. 6).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zwischen den Expressionsmustern von Kathepsin F und X ein hoch signifikanter Unterschied besteht ($p < 0,001$): Kathepsin F wird weder in Normal- noch in Tumorgeweben exprimiert. Im Gegenteil dazu ist Kathepsin X sowohl in Normal- als auch in Tumorgeweben schwach nachweisbar.

	Normalgewebe	Tumorgewebe	<i>p</i>
Kathepsin F	0,07 (0,19)	0,14 (0,29)	n.s.
Kathepsin X	0,70 (0,87)	0,83 (0,70)	n.s.

Tab. 6: Kathepsin F und X. Vergleich von Normal- und Tumorgewebe. Angabe des IRW (Standardabweichung in Klammern).

Vergleich von epithelialen und mesenchymalen Tumoren

Ein Unterschied im Färbeverhalten von Kathepsin F bei epithelialen und mesenchymalen Tumoren kann nicht festgestellt werden ($IRW = 0,10$ vs. $IRW = 0,23$; damit keine Anfärbung und kein signifikanter Unterschied) (Tab. 7).

Bei Kathepsin X hingegen besteht für epitheliale und mesenchymale Tumoren jeweils eine schwache Anfärbung ($IRW = 0,94$ vs. $IRW = 0,55$). Kathepsin X färbt sich dabei signifikant stärker in epithelialen als in mesenchymalen Tumorgeweben an ($p = 0,006$) (Tab. 7).

Weder für Kathepsin F noch für Kathepsin X besteht ein signifikanter Unterschied im Färbeverhalten zwischen Normalgewebe und epithelialen Tumorgeweben. Kathepsin F ist immunhistochemisch in beiden Gewebearten nicht nachweisbar ($IRW = 0,06$ vs. $IRW = 0,10$). Kathepsin X hingegen färbt sich jeweils schwach an ($IRW = 0,74$ vs. $IRW = 0,94$) (Tab. 8).

Für Kathepsin F besteht kein Unterschied im Färbeverhalten im Vergleich von Normalgewebe und mesenchymalen Tumoren (IRW=0,27 vs. IRW=0,23). Hingegen kann für Kathepsin X ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p<0,001$): Kathepsin X wird im mesenchymalen Normalgewebe überhaupt nicht, aber in entsprechenden mesenchymalen Tumoren schwach angefärbt (IRW=0,00 vs. IRW=0,55) (Tab. 9).

In Abb. 9 sind die Daten graphisch dargestellt.

	epitheliale Npl.	mesenchymale Npl.	<i>p</i>
Kathepsin F	0,10 (0,20)	0,23 (0,45)	n.s.
Kathepsin X	0,94 (0,74)	0,55 (0,47)	0,006

Tab. 7: Kathepsin F und X. Vergleich von epithelialen und mesenchymalen Tumorgeweben. Angabe des IRW (Standardabweichung in Klammern).

	Normalgewebe	epitheliale Npl.	<i>p</i>
Kathepsin F	0,06 (0,16)	0,10 (0,20)	n.s.
Kathepsin X	0,74 (0,88)	0,94 (0,74)	n.s.

Tab. 8: Kathepsin F und X. Vergleich des Normalgewebes mit dem entsprechenden epithelialen Tumor. Angabe des IRW (Standardabweichung in Klammern).

	Normalgewebe	mesenchymale Npl.	<i>p</i>
Kathepsin F	0,27 (0,46)	0,23 (0,45)	n.s.
Kathepsin X	0,00	0,55 (0,47)	<0,001

Tab. 9: Kathepsin F und X. Vergleich des Normalgewebes mit dem entsprechenden mesenchymalen Tumor. Angabe des IRW (Standardabweichung in Klammern).

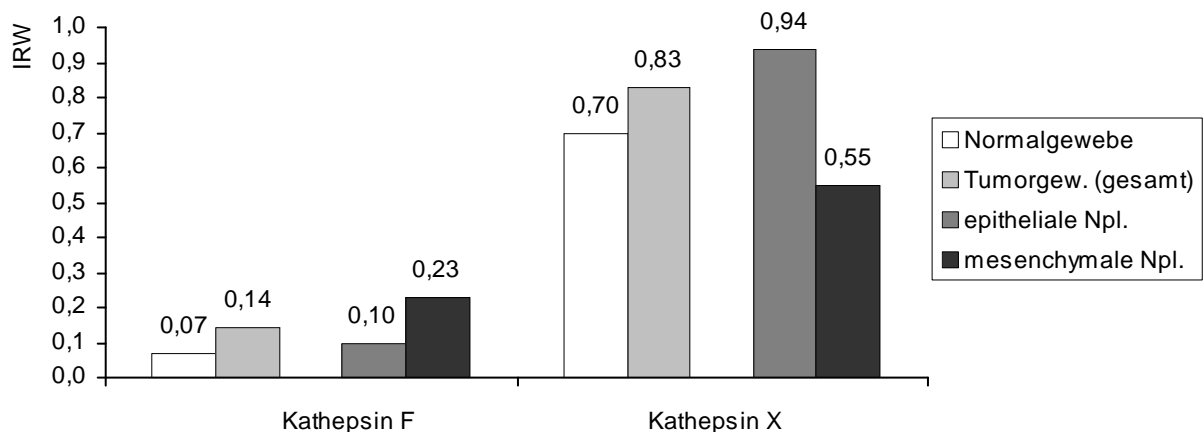


Abb. 9: Kathepsin F und X. Graphischer Vergleich von Normal- und Tumorgewebe sowie differenziert in epitheliale und mesenchymale Tumoren. Angabe des IRW.

Vergleich der Malignitätsgrade

Für Kathepsin F besteht hinsichtlich des Färbeverhaltens zwischen den drei Malignitätsgraden G1, G2 und G3 für alle Tumoren sowie aufgeschlüsselt nach epithelialen und mesenchymalen Tumoren kein signifikanter Unterschied. Kathepsin F färbt sich, auch wenn die einzelnen Malignitätsgrade gesondert betrachtet werden, nicht an (Tab. 10).

Werden alle sowie die epithelialen und mesenchymalen Tumoren gesondert hinsichtlich des Färbeverhaltens von Kathepsin X betrachtet, lässt sich feststellen, dass Kathepsin X in G1-Tumoren am schwächsten und in G3-Tumoren am stärksten exprimiert wird. Die Immunreaktivität für G2-Tumoren liegt zwischen der von G1 und G3. Es besteht jedoch nur zwischen den Malignitätsgraden G1 vs. G2 sowie zwischen G1 vs. G3 ein signifikanter Unterschied ($p=0,04$ bzw. $p=0,03$), wenn alle Tumoren zusammen analysiert werden. Für eine Differenzierung in epitheliale und mesenchymale Tumoren lässt sich kein signifikanter Unterschied finden. Bis auf den Malignitätsgrad G1 bei mesenchymalen Tumoren besteht für alle Malignitätsgrade eine schwache Positivität für Kathepsin X (Tab. 11).

In Abb. 9 und 10 sind die Daten graphisch dargestellt.

	G1	G2	G3	p (G1/G2)	p (G2/G3)	p (G1/G3)
alle Npl.	0,27	0,15	0,12	n.s.	n.s.	n.s.
epitheliale Npl.	0,18	0,10	0,16	n.s.	n.s.	n.s.
mesenchymale Npl.	0,33	0,35	0,04	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 10: Kathepsin F. Vergleich der unterschiedlichen histologischen Differenzierungsgrade (G1-G3) für die gesamten Tumorgewebe sowie speziell für epitheliale und mesenchymale Tumoren. Angabe des IRW.

	G1	G2	G3	p (G1/G2)	p (G2/G3)	p (G1/G3)
alle Npl.	0,57	1,00	1,04	0,04	n.s.	0,03
epitheliale Npl.	0,78	1,12	1,18	n.s.	n.s.	n.s.
mesenchymale Npl.	0,44	0,52	0,74	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 11: Kathepsin X. Vergleich der unterschiedlichen histologischen Differenzierungsgrade (G1-G3) für die gesamten Tumorgewebe sowie speziell für epitheliale und mesenchymale Tumoren. Angabe des IRW.

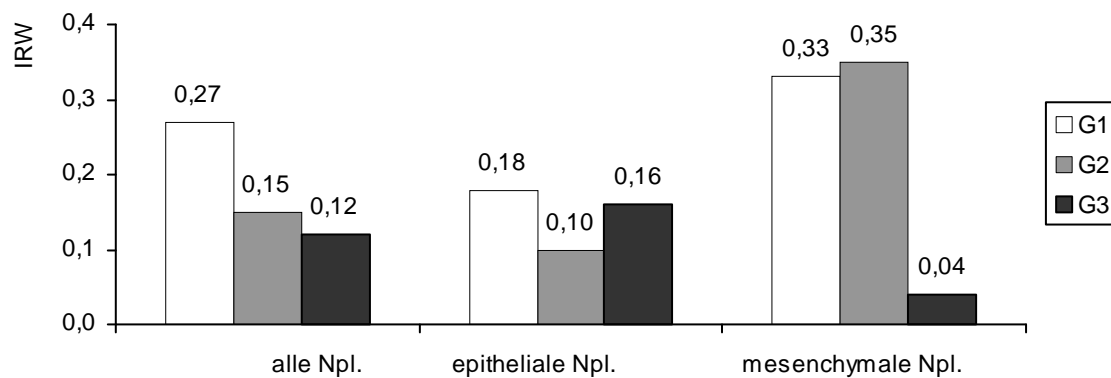


Abb. 10: Kathepsin F. Graphischer Vergleich der histologischen Differenzierungsgrade (G1-G3) für die gesamten Tumorgewebe sowie differenziert in epitheliale und mesenchymale Tumoren. Angabe des IRW.

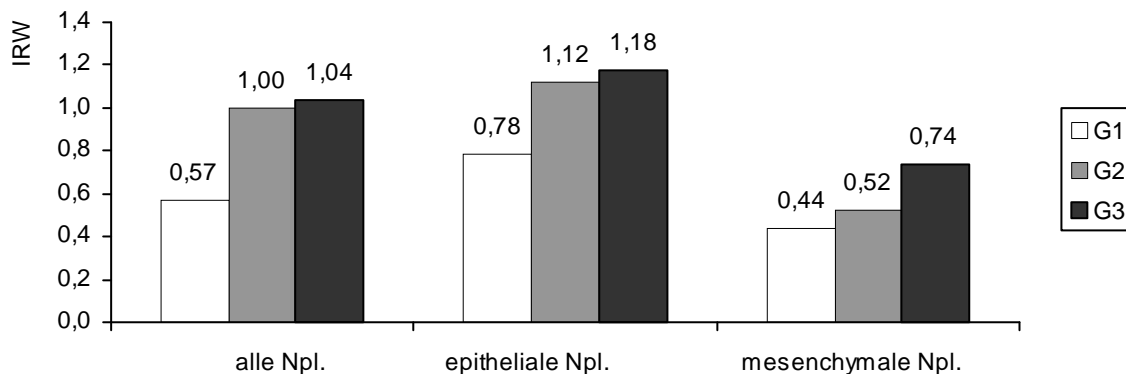


Abb. 11: Kathepsin X. Graphischer Vergleich der histologischen Differenzierungsgrade (G1-G3) für die gesamten Tumorgewebe sowie differenziert in epitheliale und mesenchymale Tumoren. Angabe des IRW.

Kathepsin F und X im gesunden Gewebe in Abhängigkeit vom Alter

Für Patienten <60 Jahre konnte für Kathepsin F in gesunden Geweben ein IRW von 0,13 errechnet werden; für Patienten ≥60 Jahre beträgt der Wert 0,04. Ein positives Färbeverhalten für Kathepsin F besteht damit für beide Altersgruppen nicht.

Für Kathepsin X dagegen beträgt der IRW für Jüngere (<60 Jahre) 0,94 und der für ältere Patienten (≥60 Jahre) 0,59. Somit besteht für beide Altersgruppen eine schwache Positivität für Kathepsin X. Ein signifikanter Unterschied besteht jedoch nicht ($p=0,23$).

Subgruppenanalysen

Sofern es sinnvoll bzw. erforderlich erschien, wurden für einige ausgewählte Fälle Subgruppenanalysen durchgeführt. Da Kathepsin F zumeist weder in gesunden noch in neoplastischen Geweben nachweisbar war, wurde hierfür - bis auf das Kolonkarzinom - keine spezifische Analyse erstellt.

Bei der Analyse von Kathepsin X bei Lungentumoren lässt sich die Tendenz, dass Kathepsin X eine stärkere Immunreaktion in Adeno- (IRW=1,70) als in Plattenepithelkarzinomen (IRW=0,80) aufweist ($p=0,09$). Adenokarzinome sind demnach mittelgradig und Plattenepithelkarzinome schwach positiv für Kathepsin X. Bei den entsprechenden Normalgeweben ist keine solche Tendenz erkennbar. Ebenfalls besteht keinerlei Unterschied im Färbeverhalten von Normal- und Tumorgewebe gegenüber Kathepsin X, wenn man sich alle elf Lungenpräparate betrachtet. Es besteht jeweils eine schwache Positivität (IRW=0,85 vs. IRW=0,99).

Der IRW für Kathepsin X in normalem Nierengewebe ist mit 2,27 höher im Vergleich zu 1,53 in neoplastischem Nierengewebe. In beiden Geweben ist damit eine mittelgradige Positivität nachweisbar. Ein signifikanter Unterschied besteht allerdings nicht ($p=0,19$).

Wie für die Niere, ist die Immunreaktivität für Kathepsin X in der gesunden Leber höher als im neoplastischen Lebergewebe (IRW=2,33 vs. IRW=1,57). Auch hier besteht kein signifikanter Unterschied ($p=0,38$).

Kathepsin X wird im gesunden Magen-Darm-Trakt (Magen, Dünn- und Dickdarm) mittelgradig stark angefärbt (IRW=0,95). Für Neoplasien im Magen-Darm-Trakt beträgt der IRW=1,41. Ein signifikanter Unterschied ist nicht zu erkennen ($p=0,13$). Für gesunde Magenschleimhaut beträgt für Kathepsin X der IRW=0,05, für gesunde Dünndarmschleimhaut 1,47 und für gesunde Dickdarmschleimhaut 0,99.

In die Fallsammlung wurden neun Kolonkarzinome aufgenommen. Dabei waren alle drei Malignitätsgrade G1 bis G3 vorhanden. Weiterhin handelt es sich mit dem Adenokarzinom um einen einheitlichen histologischen Subtyp. Kathepsin F war weder im gesunden Epithel noch im Tumorgewebe immunhistochemisch nachweisbar (IRW=0,03 vs. IRW=0,12). Kathepsin X hingegen ist im gesunden Dickdarm, wie bereits gezeigt, schwach positiv (IRW=0,99). Im Adenokarzinom des Kolons ist Kathepsin X mittelgradig positiv (IRW=1,54). Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Geweben lässt sich vielleicht noch erahnen ($p=0,11$). Ein signifikanter Unterschied besteht allerdings für das Färbeverhalten von Kathepsin X bei gut vs. schlecht differenzierten Karzinomen. So beträgt der IRW für G1-differenzierte Karzinome 1,60 und für G3-differenzierte 2,13 ($p=0,05$). Für beide Malignitätsgrade besteht demnach eine mittelgradige Positivität. Ebenfalls besteht ein signifikanter Unterschied, wenn G2- (IRW=1,08) und G3-differenzierte Karzinome betrachtet werden ($p=0,05$). Kein signifikanter Unterschied besteht zwischen G1- und G2-Karzinomen ($p=0,22$).

Mikroskopische Verteilungsmuster/Besonderheiten von Kathepsin F und X

Im Folgenden sind einige Besonderheiten bzw. Auffälligkeiten im Verteilungsmuster von Kathepsin F und X aufgeführt. Es scheint so zu sein, dass Kathepsin X vor allem im Zytoplasma lokalisiert ist. Kathepsin F dagegen scheint eher membranständig zu sein. Allerdings kann dies auch auf die meist schwache Anfärbung zurückzuführen sein.

Auffällig in den Präparaten des Ösophagus ist, dass Kathepsin X stärker in mehrkernigen Tumorriesenzellen angefärbt ist (Abb. 12A). Kathepsin F hingegen ist in diesen spezifischen Zellen nicht angefärbt.

In den Leberpräparaten fällt auf, dass Kathepsin X positiv sowohl in Tumorzellen als auch in gesunden Parenchymzellen angefärbt ist (Abb. 12B).

Kathepsin X ist deutlich positiv in Alveolarmakrophagen (Abb. 12C), nicht jedoch Kathepsin F. Dass es sich um Alveolarmakrophagen handelt, wurde durch die Berliner Blau-Reaktion bestätigt (nicht gezeigt).

In den Nieren ist auffällig, dass Kathepsin X deutlich positiv in gesunden Tubuli der Nierenrinde angefärbt ist (Abb. 12D). Glomeruli hingegen werden nicht angefärbt. Ebenfalls deutlich positiv ist Kathepsin X in den Tumorzellen (Abb. 12E).

In den Talgdrüsen der Haut ist Kathepsin F schwach positiv (Abb. 12F), Kathepsin X jedoch ist negativ.

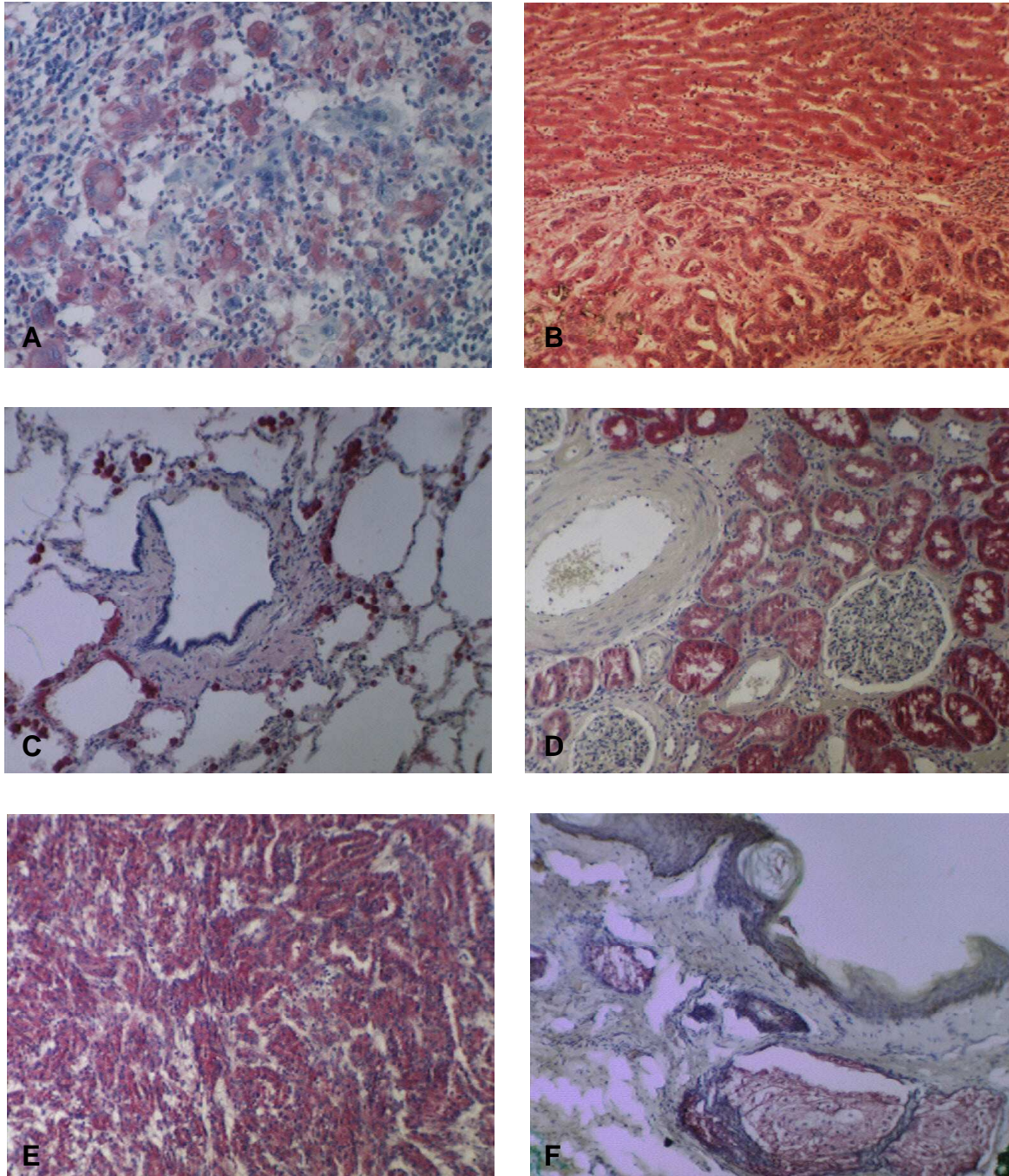


Abb. 12. Immunhistochemische Abbildungen, Kathepsin F und X. **A)** Ösophagus, Plattenepithelkarzinom, Kathepsin X, 200x. Positive Tumorzellen. **B)** Leber, cholangiozelluläres Karzinom, Kathepsin X, 100x. Lebergewebe (oben) und Karzinom (unten) positiv. **C)** Lunge, Kathepsin X, 100x. Positive Alveolarmakrophagen; Bronchialepithel negativ. **D)** Niere, Kathepsin X, 100x. Positive Tubuli; Arterie und Glomeruli negativ. **E)** Niere, chromophiles Karzinom, Kathepsin X, 100x. Positive Tumorzellen. **F)** Haut, Kathepsin F, 100x. Schwach positive Talgdrüsen; Plattenepithel negativ.

3.2 Western Blot

Kathepsin F konnte weder im Tumor- noch im gesunden Gewebe der acht verwendeten Proben via Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 13).

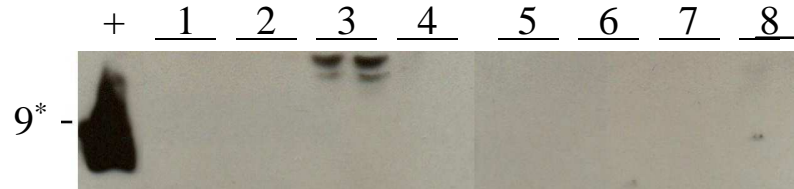


Abb. 13: Western Blot, Kathepsin F. *) Molekularmasse M_r (9.100); +) Kathepsin F; 1) Pankreaskarzinom (Tumor/Normalgewebe); 2) Kolonkarzinom (Tumor/Normalgewebe); 3) Kolonkarzinom (Tumor/Normalgewebe); 4) Pankreaskarzinom (Tumor/Normalgewebe); 5) cholangiozelluläres Karzinom (Tumor/Normalgewebe); 6) hepatozelluläres Karzinom (Tumor/Normalgewebe); 7) Ösophaguskarzinom (Tumor/Normalgewebe); 8) hepatozelluläres Karzinom (Tumor/Normalgewebe).

Kathepsin X wurde in gesunden und neoplastischen Geweben als Einzelbande mit einer Molekularmasse M_r von weniger als 40.000 nachgewiesen. Es scheint sich demnach um das reife Enzym zu handeln [Klemenčič *et al.*, 2000; Nägler *et al.*, 2004]. Kathepsin X ist in Karzinomen des Pankreas und der Speiseröhre stärker exprimiert als im entsprechenden Normalgewebe (Probe 1, 4 und 7 in Abb. 14). Hingegen ist Kathepsin X im gesunden Dickdarm und in der gesunden Leber stärker exprimiert als in den entsprechenden Karzinomen (Probe 2, 3, 6 und 8 in Abb. 14).

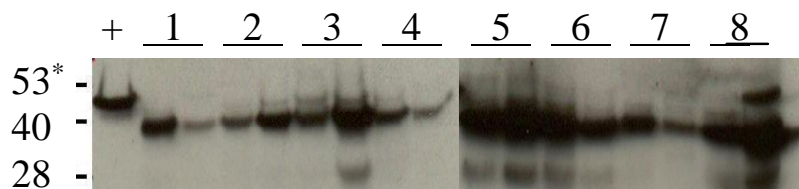


Abb. 14: Western Blot, Kathepsin X. *) Molekularmasse M_r (52.500, 40.000 bzw. 28.400); +) Pro-Kathepsin X; 1) Pankreaskarzinom (Tumor/Normalgewebe); 2) Kolonkarzinom (Tumor/Normalgewebe); 3) Kolonkarzinom (Tumor/Normalgewebe); 4) Pankreaskarzinom (Tumor/Normalgewebe); 5) cholangiozelluläres Karzinom (Tumor/Normalgewebe); 6) hepatozelluläres Karzinom (cave: Normalgewebe/Tumor); 7) Ösophaguskarzinom (Tumor/Normalgewebe); 8) hepatozelluläres Karzinom (Tumor/Normalgewebe).

4 Diskussion

Die Involvierung von Proteasen - wie z. B. der Kathepsine - an den verschiedenen Prozessen der Tumorgenese scheint gesichert. An sechs Punkten lässt sich dieses verdeutlichen: (1) Proteasen sind an der Destruktion von Normalgewebe beteiligt, (2) die Konzentration der Proteasen korreliert mit dem metastatischen Potenzial im Modell, (3) Proteaseninhibitoren verhindern die Invasion und Metastasierung im Modell, (4) Antikörper gegen verschiedene Proteasen inhibieren die Metastasierung im Modell, (5) eine Blockade des Proteasenrezeptors inhibiert die metastatische Ausbreitung, (6) eine Transfektion von Zellen mit cDNA, die für spezifischen Proteasen kodiert, erhöht das Potenzial zur Metastasierung in den Empfängerzellen [Herszényi *et al.*, 2000].

Bis heute liegen nur einige wenige Arbeiten zur Rolle der Kathepsine F und X bei malignen Tumoren vor. Für die Beteiligung von Kathepsin F bzw. X am Prostata- [Nägler *et al.*, 2004], Magen- [Krüger *et al.*, 2005] und Zervixkarzinom [Vazquez-Ortiz *et al.*, 2005] sind bereits Arbeiten vorhanden, die zeigen, dass beide Kathepsine eine Rolle in der Tumorgenese der genannten Karzinome spielen. An mesenchymalen Malignomen wurden hinsichtlich dieser beiden Kathepsine bis heute noch keine Untersuchungen durchgeführt. Generell gibt es nicht viele Arbeiten bzw. Daten zur Fragestellung „Kathepsine und mesenchymale Tumoren“. Möglicherweise ist dieses darin begründet, dass Sarkome im Vergleich zu Karzinomen seltener vorkommen.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Kathepsin F weder in Normal- noch in Tumorgewebe exprimiert wird. Dagegen färbt sich Kathepsin X sowohl in gesunden als auch in neoplastischen Geweben schwach an. Da jedoch kein signifikanter Unterschied im Färbeverhalten für Kathepsin X zwischen Normal- und Tumorgewebe besteht, scheint Kathepsin X bei malignen Tumoren insgesamt betrachtet eher keine Rolle zu spielen. Es kann jedoch festgestellt werden, dass Kathepsin X in epithelialen Neoplasien stärker exprimiert wird als in mesenchymalen Neoplasien. Wie subtil und different die Expression von Kathepsin X ist, verdeutlicht die Analyse der Lungenkarzinome: Kathepsin X scheint in Adenokarzinomen höher exprimiert zu sein als in Plattenepithelkarzinomen der Lunge ($p=0,09$).

Die immunhistochemische Analyse der Färbungen gegen Kathepsin F und X basiert auf einer subjektiven Einschätzung der Intensität der Färbung sowie des Anteils der angefärbten Zellen. Auch die Auswertung des Western Blots beruht auf Subjektivität. Eine objektivere Messung bzw. Darstellung der Verteilung von Enzymen ist

auf mRNA-Ebene möglich. Die Analyse des mRNA-Gehaltes von Zelllysaten mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion erlaubt objektivere Vergleiche zwischen zwei verschiedenen Gewebearten (z. B. Normal- und Tumorgewebe). Die relative mRNA-Expression kann dann auch graphisch dargestellt werden [Nägler *et al.*, 2004]. Eine weitere objektivere Darstellung von Proteasen in verschiedene Geweben ist die Möglichkeit, die Aktivität von Enzymen gegen ein bestimmtes synthetisches Substrat zu messen [Emmert-Buck *et al.*, 1994]. Eine dritte Möglichkeit der Quantifizierung und damit Objektivierung der Ergebnisse ist die Messung der Konzentration der Kathepsine im Zelllysate bzw. im Serum mittels eines quantitativen Enzymimmunoassays [Plebani *et al.*, 1995; Nägler *et al.*, 2006].

In der hier vorliegenden Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen an 83 Fällen durchgeführt. Dabei wurden 21 verschiedene Organe mit unterschiedlichen pathologisch-anatomischen Diagnosen untersucht. Eine Vielzahl von Organen bzw. Organsystemen sowie dazugehörige Neoplasien blieb dabei unberücksichtigt. Ein weiterer Schwachpunkt dieser Studie ist, dass nicht zu jedem Normalgewebe auch eine entsprechende Neoplasie vorlag. Es muss daher kritisch hinterfragt werden, inwieweit es von statistischer Relevanz ist, wenn nur sehr wenige Normalgewebe ($n=3$) mit mehreren mesenchymalen neoplastischen Geweben ($n=22$) verglichen werden. Um statistisch relevante Aussagen zu einzelnen Entitäten treffen zu können, müssen größere und/oder homogenere Kollektive verwendet werden. So wurden z. B. in der Arbeit von Nägler und Kollegen 44 Prostatakarzinome und 20 intraepitheliale Neoplasien mit den entsprechenden Normalgeweben miteinander verglichen. Statistische Analysen bzw. Aussagen sind somit eher möglich [Nägler *et al.*, 2004]. Allgemeine Aussagen können in der hier vorliegenden Arbeit jedoch getroffen werden.

Die Analyse der Immunhistochemie und der Western Blots zeigen zum Teil differente Ergebnisse. So ist Kathepsin X immunhistochemisch im Ösophaguskarzinom schwach und im Pankreaskarzinom überhaupt nicht nachweisbar. Im Western Blot hingegen ist Kathepsin X im Karzinomgewebe jeweils stärker nachweisbar als im gesunden Gewebe. Für die Leber stimmen die Ergebnisse zwischen Immunhistochemie und Western Blot überein: In beiden Methoden ist Kathepsin X im gesunden Gewebe stärker exprimiert als in den neoplastischen Geweben. Dagegen sind die Ergebnisse im Dickdarm wieder unterschiedlich. Immunhistochemisch ist Kathepsin X im Tumorgewebe stärker positiv als im gesunden Gewebe. Im Western Blot ist es jedoch umgekehrt. Möglicherweise sind die differenten Ergebnisse zwischen den beiden Methoden durch die niedrige Fallzahl bedingt. Daten aus größeren Serien

zeigen, dass verschiedene Methoden gleiche Ergebnisse liefern [Nägler *et al.*, 2004]. Es muss bedacht werden, dass für den Western Blot Gewebe inklusive dem Stroma bearbeitet wurde. Für die Analyse der Immunhistochemie blieb Stromagewebe gänzlich unberücksichtigt. Vielleicht wird Kathepsin X auch in verschiedenen Stromazellen exprimiert, welches dann durch den Western Blot mit detektiert wird. Um diese Frage klären zu können, sollte in weiteren Arbeiten immunhistochemisch das Stromagewebe in die Analyse mit einbezogen und so differenziert werden.

Über die Bedeutung der Kathepsine in mesenchymalen Tumoren ist noch relativ wenig bekannt. Die Kathepsine B, D und H sind in Weichgewebstumoren stärker exprimiert als Kathepsin L und S. Die Expression letzterer korreliert mit der Überlebensrate der Patienten. Ebenfalls korreliert die Lokalrezidivrate mit der Expression von Kathepsin S [Wurl *et al.*, 1997]. Kathepsin K wird eine Rolle beim invasiven Wachstum vom Chordom zugesprochen, da die Protease eine Expression und Aktivität in den Tumorzellen aufweist. Da Kathepsin K in der Chorda dorsalis allerdings nicht nachweisbar ist, soll dies implizieren, dass Kathepsin K die maligne Transformation bedingt [Häckel *et al.*, 2000]. Die verschiedenen Kathepsine B, H, K und L sind in die Progression von Chondrosarkomen involviert [Sonderstrom *et al.*, 2001]. Die Kathepsin B-Überexpression ist in Chondrosarkomen mit einer erhöhten Lokalrezidivrate sowie einem verminderten rezidivfreien Überleben assoziiert [Häckel *et al.*, 2000]. Wie bereits beschrieben, deuten Experimente *in vitro* mit Antisense-Kathepsin-B-cDNA daraufhin, dass offensichtlich auch Kathepsin B am Komplex des proteolytischen Prozesses beim invasiven Osteosarkom beteiligt ist [Krüger *et al.*, 1999].

Eine zentrale Frage der hier vorliegenden Arbeit war es, zu prüfen, ob eine Korrelation zwischen der Expression der Kathepsine F und X sowie dem histologischen Malignitätsgrad besteht. Die Literatur zeigt, dass diese Frage eher different diskutiert wird. Für verschiedenen Neoplasien konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression von Kathepsin B auf mRNA- und Proteinebene zu einem höheren Malignitätsgrad führt. So ist eine stärkere Expression von Kathepsin B auf mRNA- und Proteinebene in Modellen von Kolorektal-, Lungen-, Prostata- Urothel- und Mammakarzinomen und Gliomen mit höherer Malignität vergesellschaftet [Berquin & Sloane, 1996]. Ferner konnte gezeigt werden, dass Kathepsin B in kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu normaler Dickdarmschleimhaut und Adenomen hochreguliert ist und dass eine höhere Expression mit einer schlechteren Überlebensrate vergesellschaftet ist. Weiterhin korreliert die Kathepsin B-Expression mit dem klinischen Stadium, nicht jedoch mit dem Malignitätsgrad (n=63) [Campo *et al.*, 1994].

In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression bzw. der Proteingehalt von Kathepsin B und L im Magenkarzinom ($n=25$) sehr wohl mit dem Malignitätsgrad korreliert: In G1-Karzinomen war der Gehalt an Kathepsin B und L niedriger als in G3-differenzierten Karzinomen ($p<0,05$) [Plebani *et al.*, 1995]. Die Arbeitsgruppe um Leto untersuchte am duktalem Adenokarzinom des Pankreas, ob die Spiegel der Kathepsine B, D und L im Serum mit dem klinischen Stadium bzw. der TumorgroÙe korrelieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Serumkonzentration unabhängig vom Tumorstadium ist. Kathepsin B wird jedoch vermehrt ins Serum sezerniert bei Patienten mit akuter oder chronischer Pankreatitis sowie Pankreaskarzinom als bei Gesunden. Interessanterweise besteht zwischen diesen drei Entitäten kein Unterschied. Im Gegensatz dazu ist Kathepsin L im Serum, im Vergleich zu Gesunden sowie Patienten mit akuter oder chronischer Pankreatitis, bei Patienten mit Pankreaskarzinomen erhöht. Die Serumkonzentration der Aspartat-Protease Kathepsin D ist bei Pankreaskarzinomen im Vergleich zu gesunden Probanden nicht erhöht, jedoch bei akuter und chronischer Pankreatitis. Diese Arbeit verdeutlicht, dass Proteasen bei unterschiedlichen Erkrankungen eines Organs in unterschiedlicher Weise bzw. Stärke exprimiert bzw. sezerniert werden [Leto *et al.*, 1997] und dass sich die Funktion der Proteasen bei ubiquitärem Vorkommen nicht auf eine spezifische reduzieren lässt. Eine andere Arbeit zum duktalem Adenokarzinom des Pankreas konnte allerdings zeigen, dass die Expression der Kathepsine B und L mit dem Tumorgrading korreliert: In G3-Tumoren waren die beiden Kathepsine stärker exprimiert als in G1- und G2-Tumoren. In dieser Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass die beiden Kathepsine starke und unabhängige prognostische Marker sind (im Gegensatz zu klinischem Stadium, TumorgroÙe, Lymphknotenstatus oder Tumorgrading) [Niedergethmann *et al.*, 2004]. Untersuchungen am Kolonkarzinom zeigen, dass die Positivität der Tumorzellen für Kathepsin B nicht mit dem histologischen Grading korrelieren. Im Gegensatz ist Kathepsin B vermehrt exprimiert in den Stadien Dukes A und B im Vergleich zu Dukes C. Weiterhin findet man eine signifikant stärkere Expression dieser Protease in metastasierten als in nicht-metastasierten Karzinomen. Im malignen Gewebe ließ sich Kathepsin B-mRNA 3,7-fach höher nachweisen als im Normalgewebe. Erstaunlicherweise findet man in Dukes A-Stadien die höchste mRNA-Expression, gefolgt von Stadien mit Fernmetastasen. Die Autoren schlussfolgern, dass eine vermehrte Kathepsin B-Expression lokale Tumordinvasion in frühen Stadien und die Fernmetastasierung bedingt. Ein interessanter Aspekt ist ferner noch, dass die Expression des Inhibitors Cystatin C keinen Effekt auf die Kathepsin B-Expression hat [Hirai *et al.*, 1999]. Die Expression von Kathepsin D im Mammakarzinom korreliert nicht mit dem histologischen Grading, TumorgroÙe oder Lymphknotenstatus [Roger *et al.*,

1994]. Dieses kann durch eine weitere Arbeit belegt werden. Castiglioni *et al.* kommen ebenfalls zu dem Schluss, dass die Kathepsine B, D und L im Mammakarzinom im Expressionsgrad mit dem klinischen Stadium und der Tumorgröße korreliert [Castiglioni *et al.*, 1994].

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen zwar ebenfalls ein Korrelation von Kathepsin X mit dem Malignitätsgrad, allerdings wird Kathepsin X hier bei gut differenzierten Tumoren (G1) weniger stark exprimiert als bei schlecht differenzierten Tumoren (G3). Die Werte für G2-Tumoren liegen dazwischen. Es besteht aber nur ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen G1- und G3-Tumoren. Betrachtet man alle Tumorgewebe zusammen, besteht aber speziell für epitheliale und mesenchymale Tumoren kein signifikanter Unterschied. Für Kathepsin F ließ sich dagegen gar keine Korrelation zwischen Expressions- und Malignitätsgrad nachweisen. Bei den Adenokarzinomen des Kolons aus der hier vorliegenden Arbeit lässt sich für Kathepsin X die Aussage von Plebani und Mitarbeiter zum Expressions- und Malignitätsgrad bestätigen. Kritisch angemerkt werden muss jedoch, dass es sich hier nur um neun Karzinome handelt [Plebani *et al.*, 1995]. Interessanterweise besteht zwischen der Expression von Kathepsin X in Magenkarzinomen und dem Ausbreitungsstadium (TNM) der Tumoren keine Korrelation [Krüger *et al.*, 2005]. Die Immunreaktivität von Kathepsin X im Prostatakarzinom zeigt keine Beziehung zur histologischen Graduierung nach Gleason [Nägler *et al.*, 2004]. Im Kontrast dazu konnte allerdings für Kathepsin B eine positive Korrelation zwischen der Immunreaktivität und dem Gleason-Score für das Prostatakarzinom gefunden werden [Sinha *et al.*, 1995]. Warum für Kathepsin B und X diesbezüglich Unterschiede bestehen, ist unklar. Wie in den zuvor genannten Arbeiten sollten die Ergebnisse für Kathepsin X durch weitere Studien mit klinischen Daten verglichen und in Korrelation gebracht werden.

Die Arbeitsgruppe um Nägler verwendete für ihre Studien am Prostatakarzinom ein ähnliches Punktesystem für die Immunreaktivität für Kathepsin F und X, wie in der hier vorliegenden Arbeit. Auch hier wurde die Anzahl der positiven Zellen sowie deren Intensität bewertet. Es war genauso ein berechneter Punktwert von 0 bis 3 möglich. Es konnte ein mittlerer Punktwert für Kathepsin F von 0,21 und für Kathepsin X von 1,90 errechnet werden. Im Prostatakarzinom ist folglich Kathepsin F immunhistochemisch nicht nachweisbar und Kathepsin X mittelgradig positiv. Interessanterweise beträgt der Kathepsin F-Punktwert für die intraepitheliale Neoplasie im Mittel 0,30 und der Kathepsin X-Punktwert 1,93. Für beide Enzyme liegt der Punktwert in der intraepithelialen Neoplasie höher als beim Karzinom. Es besteht ein hoch signifikanter

Unterschied in der Immunreaktivität für Kathepsin X sowohl für das Karzinom als auch für intraepitheliale Neoplasie - verglichen mit dem entsprechenden Normalgewebe ($p < 0,001$). Für die Kathepsine B, F und L besteht dagegen kein statistischer Unterschied [Nägler *et al.*, 2004].

Kathepsin F und X wurden immunhistochemisch intrazellulär nachgewiesen. Um extrazelluläre Matrix degradieren und damit die Invasivität und Metastasierung von malignen Tumoren initiieren und vorantreiben zu können, müssen die Kathepsine von den Tumorzellen sezerniert werden. Es konnte anhand muriner Plattenepithelkarzinomzellen gezeigt werden, dass durch diese Zellen vermehrt die Pro-Kathepsine B, D und L sezerniert werden, im Vergleich zu nicht-tumoröse Zellen. Offensichtlich spielt der Mannose-6-Phosphat/Insulin-artiger Wachstumsfaktor II-Rezeptor dabei eine wichtige Rolle. Dieser Rezeptor ist am intrazellulären Transport lysosomaler Enzyme beteiligt. Die genannten Plattenepithelzellen sind defizient in diesem Rezeptor, was dann wohl zu einer vermehrten Sekretion der Kathepsine führt [Lorenzo *et al.*, 2000]. Unklar ist noch, ob diese Beobachtungen auch für die Kathepsine F und X sowie auf Verhältnisse *in vivo* übertragbar sind.

4.1 Rolle von Kathepsin F

Die Rolle von Kathepsin F in Neoplasien wird kontrovers diskutiert. Die Arbeit von Nägler und Kollegen aus dem Jahr 2004 konnte zeigen, dass die vermutete Rolle von Kathepsin F in Neoplasien wahrscheinlich nicht zutrifft. So wird Kathepsin F z. B. weder in gesundem noch in neoplastischem Prostatagewebe exprimiert [Nägler *et al.*, 2004]. Dagegen ist Kathepsin F neben den Matrixmetalloproteasen 11 und 12 in dys- und neoplastischen Zellen der Zervix uteri überexprimiert. Es wird daher vermutet, dass u. a. Kathepsin F ein Marker für die Progression des Zervixkarzinoms darstellt [Vazquez-Ortiz *et al.*, 2005].

Möglicherweise spielt Kathepsin F eine Rolle im Immunsystem. In murinen Makrophagen, als Komponente der antigenpräsentierenden Zellen (APC; dendritische Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen), wirkt es bei der Reifung des Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse II (MHC-II) mit. Kathepsin F spaltet die invariante Kette (Iip10), so dass das Klasse-II-assoziierte-invariante-Ketten-Peptid (CLIP) entsteht. Kathepsin F ist bei der Generierung von CLIP genauso effektiv wie Kathepsin S. Kathepsin X wird zwar auch in murinen Makrophagen exprimiert, ist aber nicht an

der CLIP-Generierung und damit nicht an der MHC-II-Antigenpräsentation beteiligt [Shi *et al.*, 2000]. Für Kathepsin S wird schon seit längerem eine Mitwirkung an der Antigenpräsentation vermutet [Riese *et al.*, 1996; Brömme, 1999]. Eine Inhibition von Kathepsin F könnte zur Behandlung von Erkrankungen mit einer exzessiv gesteigerten bzw. inadäquaten Immunantwort (z. B. Asthma bronchiale, rheumatoide Arthritis und andere Immunerkrankungen) beitragen. Strukturanalysen von Kathepsin F zeigen eine gut definierte Bindungsstelle, die sich von anderen Kathepsinen unterscheidet. Dies suggeriert Wege zur selektiven Inhibition des Enzyms [Somoza *et al.*, 2002]. In dendritischen Zellen sowie in den B-Lymphozyten wird Kathepsin F offensichtlich nicht exprimiert, jedoch in Granulozyten [Nägler *et al.*, 2004].

Kathepsin F wird eine nicht unbedeutende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose zugesprochen. So baut dieses Enzym extrazelluläres Lipoprotein hoher Dichte (HDL, high-density lipoprotein) ab. HDL dient als Akzeptor des intrazellulär gelegenen Cholesterols der Schaumzellen (Makrophagen). Somit ist der Efflux und der Abtransport des Cholesterols aus der Intima der Arterien gestört und atherosklerotische Läsionen werden dadurch aufrechterhalten [Lindstedt *et al.*, 2003]. Weiterhin modifiziert Kathepsin F Lipoprotein niedriger Dichte (LDL, low-density lipoprotein), was somit zur Akkumulation von Lipiden in der extrazellulären Matrix der Intima führt und damit ein Glied in der Pathogenese der Atherosklerose darstellt [Öörni *et al.*, 2004].

Die Region q13.1-3 auf Chromosom 11 wird mit Erkrankungen wie dem Zervixkarzinom, Meckel-Syndrom, kongenitaler Fibrose der extraokulären Muskeln und Osteopetrose in Verbindung gebracht. Bis dato ist noch nicht klar, ob diese Erkrankungen auch mit Kathepsin F, dessen Gen ebenfalls in dieser Region liegt, in Zusammenhang gebracht werden können [Wex *et al.*, 1999a], wie es bereits für die Kathepsine C und K erfolgt ist (siehe Abschnitt 1.2.1).

Bei Kathepsin F-defizienten älteren Mäusen kommt es zu einem lysosomalen Speicherdefekt und zu progressiven neurologischen Erscheinungen bis hin zum Tod. Die Symptome sowie die akkumulierten lysosomalen Granula passen zur bekannten Diagnose der neuronalen Lipofuszinose [Tang *et al.*, 2006]. Diese Ergebnisse suggerieren, dass Kathepsin F offensichtlich unabdingbar zur Aufrechterhaltung von physiologischen Prozessen im Nervensystem ist. Bekräftigt wird diese Annahme, dass Kathepsin F, im Gegensatz zu anderen Kathepsinen, im Gehirn vermehrt exprimiert wird (siehe Abschnitt 1.2.2).

Kathepsin F wurde in Talgdrüsen der Haut nachgewiesen. Dieses deutet daraufhin, dass Kathepsin F wie die Kathepsine B und L physiologische Rollen in den Hautdrüsen übernehmen [Fröhlich *et al.*, 1993; Tobin *et al.*, 2002].

4.2 Rolle von Kathepsin X

Sowohl in den intraepithelialen Neoplasien der Prostata als auch im Prostatakarzinom als solches wird Kathepsin X signifikant stärker exprimiert als im gesunden Gewebe. Kathepsin X spielt somit womöglich eine Rolle in der frühen Tumorgenese des Prostatakarzinoms [Nägler *et al.*, 2004]. Ähnlich wurde die Rolle von Kathepsin K in der Tumorgenese des Chondroms diskutiert [Häckel *et al.*, 2000].

Es verdichten sich Hinweise, dass Kathepsin X an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist. Kathepsin X wird hauptsächlich in Monozyten und Makrophagen exprimiert [Nägler *et al.*, 2004; Bühling *et al.*, 2004; Krüger *et al.*, 2005; Nägler *et al.*, 2006]. Die Arbeitsgruppe um Nägler konnte kürzlich einen hoch sensitiven und spezifischen Immunoassay entwickeln, mit dem es möglich ist, Kathepsin X in Leukozyten und im Plasma quantitativ zu bestimmen. Im Zeitraum von 72 Stunden nach einem Trauma steigt der Plasmaspiegel von Kathepsin X signifikant an. Im Vergleich zu dem etablierten Entzündungsmarker Neutrophilenelastase konnte mittels Kathepsin X-Spiegeln das Überleben in der späten posttraumatischen Phase mit einer höheren Signifikanz vorhergesagt werden [Nägler *et al.*, 2006].

Kathepsin X wird in der Magenschleimhaut gesunder Patienten in Makrophagen, nicht jedoch in Epithelzellen, exprimiert. Interessanterweise wird Kathepsin X-mRNA und -Protein bei Patienten mit *Helicobacter pylori*- (*H. pylori*) Gastritis stärker exprimiert als bei *H. pylori*-negativen Patienten [Bühling *et al.*, 2004; Krüger *et al.*, 2005]. Nach Infektion der Magenschleimhaut mit *H. pylori* war Kathepsin X auch an der apikalen Seite tiefer antraler Foveolardrüsen nachweisbar [Bühling *et al.*, 2004]. Die Infektion durch *H. pylori* bewirkt eine Immunantwort vom T_H1-Typ (inflammatorische CD4-T-Lymphozyten) [Mohammandi *et al.*, 1996], weshalb angenommen wird, dass Kathepsin X auch eine Rolle bei entzündlichen Prozessen spielt, die eine T_H1-Immunantwort bewirken, wie z. B. anderen Infektionen, Morbus Crohn und akute Abstoßungsreaktionen [Bühling *et al.*, 2004]. Ebenfalls hochreguliert war Kathepsin X in Magenkarzinomen (im Vergleich zu nicht-neoplastischen Mägen). Letzteres kann auch anhand der in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse demonstriert werden,

wenngleich es nur drei Magenkarzinome waren. Durch Untersuchungen *in vitro* konnte gezeigt werden, dass es durch *H. pylori*-infizierte Zellen zu einem Anstieg der Expression von Kathepsin X in Monozyten kommt. Ebenfalls durch *in vitro*-Untersuchungen wurde demonstriert, dass eine Hochregulierung von Kathepsin X durch Antisenseoligonukleotide eine stärkere Invasivität von Magenkarzinomen bewirkt. Die Autoren schlussfolgern, dass Kathepsin X nicht nur eine Rolle bei chronischen Entzündungen in der Magenschleimhaut spielt, sondern auch in die Tumorgenese des Magenkarzinoms involviert ist [Krüger *et al.*, 2005].

Kos und Kollegen schreiben Kathepsin X nicht eine Rolle in der Degradation von extrazellulärer Matrix, sondern vielmehr eine in der Phagozytose und in der Regulation von Immunantworten zu [Kos *et al.*, 2005]. Die Autoren begründen das dadurch, dass Kathepsin X in immunhistochemischen Analysen in Lungentumor infiltrierende Histiozyten, Alveolarmakrophagen, Bronchialepithelien und Alveolarzellen Typ II nachweisbar ist. Weiterhin ist Kathepsin X in CD68-Zellen (physiologischerweise z. B. Makrophagen, Monozyten) in Keimzentren von Lymphknoten nachweisbar. Auf Proteinebene lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von Kathepsin X in Gewebe aus Lungentumoren und angrenzendem gesunden Lungengewebe feststellen. Im Gegensatz dazu ist die Expression von Kathepsin B mehr als neunmal höher in Tumor- als im gesunden Gewebe. In den immunhistochemischen Analysen wurde eine schwache Anfärbung für Kathepsin X gefunden. Ähnliche Ergebnisse können auch an dieser Arbeit zugrunde liegenden Präparaten präsentiert werden: Alveolarmakrophagen zeigen eine deutliche Positivität im Färbeverhalten gegenüber Kathepsin X (Abb. 10C). Außerdem besteht jeweils für normales und neoplastisches Lungengewebe eine schwache Positivität für Kathepsin X. Es scheint so zu sein, dass Adenokarzinome der Lunge Kathepsin X stärker exprimieren als Plattenepithelkarzinome ($p=0,09$). Es sollte durch weitere Arbeiten spezifisch untersucht werden, ob Kathepsin X ubiquitär, wie die Kathepsine B und L in CD68-positiven Makrophagen exprimiert wird, oder ob diesem Enzym eine spezifischere Aufgabe bezüglich Immunantwort zugesprochen werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass Kathepsin K nicht ubiquitär in Makrophagen exprimiert wird, sondern nur in speziell differenzierten Makrophagen (Epitheloidzellen oder multinukleären Riesenzellen in Weichgeweben). Kathepsin K scheint somit ein Marker für die Makrophagen-Differenzierung zu sein [Bühling *et al.*, 2001].

Dass Kathepsin X an der Degradation von extrazellulärer Matrix und größeren Molekülen direkt beteiligt ist, wie bereits für die Kathepsine B, L und K beschrieben

wurde [Chapman *et al.*, 1997; Turk *et al.*, 2001], ist aufgrund der Carboxypeptidaseaktivität eher unwahrscheinlich [Bühling *et al.*, 2004]. Eine andere Hypothese könnte sein, dass Kathepsin X am abschließenden „Schliff“ der Prozessierung von bioaktiven Molekülen, wie Zytokine oder Wachstumsfaktoren, die spezifisch für T_H1-Immunantworten exprimiert werden, beteiligt ist [Bühling *et al.*, 2004].

Wie bereits weiter oben dargestellt, besteht für Kathepsin X im gesunden Nierenparenchym eine mittelgradige Immunreaktivität. Kathepsin X färbt sich in den Tubuli der Nierenrinde, nicht jedoch in den Glomeruli oder den Gefäßen an (Abb. 10D, Abschnitt 3.1). Der IRW für neoplastisches Nierengewebe ist geringer (Abb. 10E) als im gesunden Gewebe. Es ist bereits bekannt, dass die Kathepsine B, C, H, L und S in gesunden Nieren stärker als in Nierenkarzinomen exprimiert werden [Kirschke *et al.*, 1997]. Ähnliche Aussagen lassen sich auch für die Leber treffen. Der IRW ist im gesunden Lebergewebe größer als der IRW für neoplastisches Lebergewebe. Ein signifikanter Unterschied besteht jedoch nicht. Kritisch angemerkt werden muss allerdings, dass es sich nur um vier Nieren- und drei Leberpräparate handelt. Offensichtlich wird Kathepsin X eine nicht unerhebliche Rolle in der gesunden Niere und Leber zu teil. Wenn man bedenkt, dass Niere und Leber die Hauptorgane des Stoffwechsels im menschlichen Organismus darstellen, ist dieses auch nicht verwunderlich. An der Pathogenese von Nieren- und Lebertumoren ist Kathepsin X offensichtlich eher weniger beteiligt.

Wie aus den hier vorliegenden Ergebnissen ersichtlich, wird Kathepsin X im Magen-Darm-Trakt, im Vergleich zu einigen anderen Organen bzw. Organsystemen, im Normal- und auch im Karzinomgewebe exprimiert. Den Kathepsinen (speziell Kathepsin B, H und L) werden im Magen und Zwölffingerdarm zwei wesentliche Funktionen zugeschrieben: Zum einen spalten die Kathepsine die in Lysosomen aufgenommenen Proteine und Peptide, und zum anderen könnten sie an der Prozessierung von biologisch aktiven Peptiden (enterische Hormone) aus den Vorläuferproteinen beteiligt sein [Furuhashi *et al.*, 1991]. Die höchste Aktivität für Kathepsin X im Magen-Darm-Trakt ist mit einem relativ hohen IRW von 1,47 im gesunden Dünndarm zu finden. Somit scheinen Kathepsine auch im Darm physiologische Aufgaben zu übernehmen.

Die enzymatische Aktivität von Kathepsin B ist in Kolonkarzinomen 2,3-fach höher ($p < 0,005$) als in normalen Epithelzellen des Dickdarms [Emmert-Buck *et al.*, 1994]. Durch Vergleiche der Immunreaktivität von Kathepsin X in der hier vor-

liegenden Arbeit kann dieses in etwa bestätigt werden. Die Immunreaktivität von Kathepsin X ist im karzinomatösen Gewebe 1,6-fach höher ($p=0,11$) als im gesunden Epithel. Kathepsin X scheint daher an der Genese von Kolonkarzinomen beteiligt zu sein.

Möglicherweise spielt Kathepsin X ebenso wie Kathepsin F eine Rolle in der Genese der Atherosklerose, da dieses Enzym vor allem in Schaumzellen in atherosklerotischen Plaques der Halsschlagader gefunden wird [D. Sachwitz, 2006; persönliche Mitteilung].

Es scheint so zu sein, dass Kathepsin X physiologisch, d. h. im gesunden Gewebe, bei älteren Patienten eher weniger stark exprimiert wird. Für Kathepsin F lässt sich hingegen kein Unterschied feststellen. Diese Ergebnisse könnten dafür sprechen, dass die Kathepsin X-exprimierenden Organe einer Altersinvolution unterliegen, wie es z. B. beim Thymus bekannt ist.

4.3 Schlussfolgerungen

Die beiden Kathepsine F und X werden unterschiedlich exprimiert. Die Bedeutung von Kathepsin F ist noch nicht klar, da es in dieser Untersuchung weder in Normal- noch in Tumorgewebe vorkommt. Kathepsin F und X scheinen für immunologische/inflammatorische Prozesse sowie bei der Atherosklerose nicht unwichtig zu sein. Kathepsin X spielt bei einigen Tumoren (Prostata-, Bronchialkarzinom und Tumoren des Gastrointestinaltraktes) eine Rolle. In mesenchymalen Neoplasien, im Vergleich zu epithelialen, ist Kathepsin X eher unbedeutend. An physiologischen Prozessen im Nervensystem und sekretorischen Drüsen (Kathepsin F) sowie im Dünndarm, der Leber und der Niere (Kathepsin X) sind die Proteasen möglicherweise beteiligt. Die Funktion von Kathepsin F und X lässt sich vermutlich nicht auf eine spezifische reduzieren. Für weitere Untersuchungen sind größere Fallzahlen und homogenere Entitäten erforderlich. Klinische Daten sollten mit in die Analysen einbezogen werden.

5 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Frage erörtert werden, ob und wenn ja, inwieweit die erst kürzlich näher charakterisierten Kathepsine F und X bei malignen Tumoren eine Rolle spielen. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Kathepsin F und X an in Paraffin eingebetteten Präparaten durchgeführt. Es wurde sowohl normales als auch neoplastisches Gewebe vom selben Patienten untersucht und miteinander verglichen. Die Ergebnisse sollten mit der Immundetektion via Western Blot exemplarisch verifiziert werden. Zusammenfassend lassen sich folgende Feststellungen treffen:

- Die Kathepsine F und X werden unterschiedlich exprimiert.
- Kathepsin F wird weder in Normal- noch in Tumorgeweben exprimiert. Dagegen ist Kathepsin X sowohl in normalen als auch in neoplastischen Geweben schwach positiv immunhistochemisch nachweisbar.
- Für Kathepsin F besteht kein Unterschied im Färbeverhalten zwischen epithelialen und mesenchymalen Tumoren. Dagegen ist Kathepsin X in epithelialen Tumoren signifikant stärker positiv als in mesenchymalen Tumoren.
- Es besteht kein Unterschied im Färbeverhalten für Kathepsin F und X im Vergleich von gesunden und dem entsprechenden epithelialen neoplastischen Gewebe. Ebenfalls besteht kein Unterschied für Kathepsin F bei der Analyse von Normal- und mesenchymalen neoplastischen Geweben. Hingegen ist Kathepsin X in mesenchymalen neoplastischen Geweben signifikant stärker positiv als in den entsprechenden gesunden Geweben.
- Für Kathepsin F besteht hinsichtlich der drei Malignitätsgrade G1, G2 und G3 kein signifikanter Unterschied im Färbeverhalten. Dagegen ist Kathepsin X sowohl in epithelialen als auch in mesenchymalen G3-Tumoren stärker positiv als in G2- und in G1-Tumoren. Jedoch besteht nur ein signifikanter Unterschied für Kathepsin X zwischen den Malignitätsgraden G1 vs. G2 und für G1 vs. G3, wenn alle Neoplasien zusammen betrachtet werden.
- Kathepsin X wird bei jüngeren Patienten stärker exprimiert als bei älteren. Ein signifikanter Unterschied besteht jedoch nicht.

- Adenokarzinome der Lunge sind stärker immunpositiv für Kathepsin X als Plattenepithelkarzinome. Sowohl im gesunden Nieren- als auch im gesunden Lebergewebe ist Kathepsin X stärker positiv als in den Neoplasien. Kathepsin X wird im Kolonkarzinom stärker exprimiert als im entsprechenden gesunden Gewebe. Ähnliches lässt sich auch für den gesamten Magen-Darm-Trakt feststellen. In G3-Kolonkarzinomen ist Kathepsin X stärker positiv als in G1-Karzinomen. In mehrkernigen Tumorzellen des Ösophaguskarzinoms ist Kathepsin X vermehrt nachweisbar. Kathepsin X ist deutlich immunpositiv in Alveolarmakrophagen. Weiterhin lässt sich Kathepsin X in gesunden Nierentubuli, nicht hingegen in den Glomeruli nachweisen. Kathepsin F ist in Talgdrüsen der Haut positiv.
- Die Daten der beiden Methoden Immunhistochemie und Western Blot sind aufgrund der wenigen Fälle nicht ohne weiteres vergleichbar.
- Kathepsin X scheint bei ausgewählten Neoplasien eine Rolle zu spielen. Möglicherweise ist Kathepsin X auch an spezifischen Prozessen, wie der Immunabwehr sowie am Stoffwechsel in der Niere, der Leber und im Dünndarm beteiligt.
- Die Ergebnisse sollten durch weitere und subtilere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen und homogenen Entitäten verifiziert werden. Weiterhin sollten klinische Daten mit in die Analysen einbezogen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Barrett AJ: Classifications of peptidases. *Methods Enzymol* 1994;244:1-15.
2. Barrett AJ, Rawlings ND: Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol Chem* 2001;382:727-733.
3. Belling O, Ottesen K, Meyer W, Feller AC, Merz H: Vergleichende Analyse verschiedener immunhistochemischer Standardverfahren. *Pathologe* 1999;20: 242-250.
4. Berquin IM, Sloane BF. Cysteine proteases and tumor progression. *Perspect Drug Discovery Des* 1994;2:371-388.
5. Berquin IM, Sloane BF. Cathepsin B expression in human tumors. In: Suzuki K, Bond J: *Intracellular Protein Catabolism*. S. 281-294, Plenum Press, New York, 1996.
6. Böcker W, Denk H, Heitz PU: *Pathologie*. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1997.
7. Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M, Levy MA: Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K - expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* 1996;271:12517-12524.
8. Brömme D, Okamoto K, Wang BB, Biroc S: Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1996;271:2126-2132.
9. Brömme D: Cysteine proteases as therapeutic targets. *Drug News Perspect* 1999;12:73-82.
10. Bühling F, Fengler A, Brandt W, Welte T, Ansorge S, Nögler DK: Review: novel cysteine proteases of the papain family. *Adv Exp Med Biol* 2000a;477:241-254.
11. Bühling F, Waldburg N, Gerber A, Häckel C, Krüger S, Reinhold D, Brömme D, Weber E, Ansorge S, Welte T: Cathepsin K expression in human lung. *Adv Exp Med Biol* 2000b;477: 281-286.
12. Bühling F, Reisenauer A, Gerber A, Krüger S, Weber E, Brömme D, Roessner A, Ansorge S, Welte T, Röcken C: Cathepsin K - a marker of macrophage differentiation? *J Pathol* 2001; 195:375-382.

13. Bühling F, Peitz U, Krüger S, Küster D, Vieth M, Gebert I, Roessner A, Weber E, Malfertheiner P, Wex T. Cathepsins K, L, B, X and W are differentially expressed in normal and chronically inflamed gastric mucosa. *Biol Chem* 2004;385:439-445.
14. Campo E, Muñoz J, Miquel R, Palacín A, Cardesa A, Sloane BF, Emmert-Buck MR: Cathepsin B expression in colorectal carcinoma correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Am J Pathol* 1994;145:301-309.
15. Castiglioni T, Merino MJ, Elsner B, Lah TT, Sloane BF, Emmert-Buck MR: Immunohistochemical analysis of cathepsins D, B, and L in human breast cancer. *Hum Pathol* 1994;25:857-862.
16. Chapman HA, Riese RJ, Shi GP: Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 1997;59:63-88.
17. Denk H: Immunhistochemische Färbemethoden. In: Böck P: *Romeis Mikroskopische Technik*. S. 251-261, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1989.
18. Deussing J, von Olshausen I, Peters C: Murine and human cathepsin Z: cDNA-cloning, characterization of the genes and chromosomal localization. *Biochim Biophys Acta* 2000;1491:93-106.
19. Devanathan G, Turnbull JL, Ziomek E, Purisima EO, Ménard R, Sulea T: Carboxy-monopeptidase substrate specificity of human cathepsin X. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329:445-452.
20. de Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F: Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* 1955;60:604-617.
21. Emmert-Buck MR, Roth MJ, Zhuang Z, Campo E, Rozhin J, Sloane BF, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG: Increased gelatinase A (MMP-2) and cathepsin B activity in invasive tumor regions of human colon cancer samples. *Am J Pathol* 1994;145:1285-1290.
22. Esser RE, Angelo RA, Murphey MD, Watts LM, Thornburg LP, Palmer JT, Talhouk JW, Smith RE: Cysteine proteinase inhibitors decrease articular cartilage and bone destruction in chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:236-247.

23. Farinati F, Herszényi L, Plebani M, Carraro P, Paoli M de, Cardin R, Rovergoni G, Rugge M, Nitti D, Grigioni WF, D'Errico A, Naccarato R: Increased levels of cathepsin B and L, urokinase-type plasminogen activators and its inhibitor type-1 as an early event in gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1996;17:2581-2587.
24. Fonovic M, Brömme D, Turk V, Turk B: Human cathepsin F: expression in baculovirus system, characterization and inhibition by protein inhibitors. *Biol Chem* 2004;385:505-509.
25. Fröhlich E, Schaumburg-Lever G, Klessen C: Immunelectron microscopic localization of cathepsin B in human exocrine glands. *J Cutan Pathol* 1993; 20:54-60.
26. Furuhashi M, Nakahara A, Fukutomi H, Kominami E, Grube D, Uchiyama Y: Immunocytochemical localization of cathepsins B, H, and L in the rat gastroduodenal mucosa. *Histochemistry* 1991;95:231-239.
27. Garnerio P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drakel FH, McQueney MS, Foged NT, Delmas PD, Delaissé JM: The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem* 1998;273:32347-32352.
28. GEKID und RKI: Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 2006.
29. Gelb BD, Shi G, Chapman HA, Desnick RJ: Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* 1996;273:1236-1238.
30. Gerber A, Welte T, Ansorge S, Bühling F: Expression of cathepsins B and L in human lung epithelial cell is regulated by cytokines. *Adv Exp Med Biol* 2000;477:287-292.
31. Guay J, Falgout JP, Ducret A, Percival MD, Mancini JA: Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L, and S by their respective propeptides. *Eur J Biochem* 2000;267:6311-6318.
32. Häckel CG, Krüger S, Grote HJ, Oshiro Y, Hodges S, Johnston DA, Johnson ME, Roessner A, Ayala AG, Czerniak B: Overexpression of cathepsin B and urokinase plasminogen activator is associated with increased risk of recurrence and metastasis in patients with chondrosarcoma. *Cancer* 2000;89:995-1003.
33. Häckel C, Krüger S, Bühling F, Brömme D, Franke D, Schütze A, Röse I, Roessner A: Expression of cathepsin K in the human embryo and fetus. *Dev Dyn* 1999;219: 89-95.

34. Häckel C, Krüger S, Küster D, Ostertag H, Samii M, Bühling F, Brömme D, Czerniak B, Roessner A: Expression of cathepsin K in chondroma. *Hum Pathol* 2000;31:834-840.
35. Herszényi L, Plebani M, Carraro P, de Paoli M, Roveroni G, Cardin R, Foschia F, Tulassay Z, Naccarato R, Farinati F: Proteases in gastrointestinal neoplastic diseases. *Clin Chim Acta* 2000;291:171-187.
36. Hirai K, Yokoyama M, Asano G, Tanaka S: Expression of cathepsin B and cystatin C in human colorectal cancer. *Hum Pathol* 1999;30:680-686.
37. Ho JD, Meltzer Y, Buggy JJ, Palmer JT, Elrod KC, Chan H, Mortara KD, Somoza JR: Expression purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human cathepsin F complexed with an irreversible vinyl sulfone inhibitor. *Acta Cryst* 2002;D58:2187-2190.
38. Hsu S, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-580.
39. Jutras I, Reudelhuber TL: Prorenin processing by cathepsin B in vitro and in transfected cells. *FEBS Lett* 1999;443:48-52.
40. Kekow J, Pap T, Zielinski S: Multifunctional role of proteases in rheumatic diseases. *Adv Exp Med Biol* 2000;477: 467-476.
41. Kirschke H, Barrett AJ: Chemistry of lysosomal proteases. In: Glaumann H, Ballard FJ: *Lysosomes: Their role in protein breakdown*. S. 193-238, Academic Press, London, 1987.
42. Kirschke H, Barrett AJ, Rawlings ND: Proteinases 1: Lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* 1995;2:1587-1643.
43. Kirschke H: Lysosomal cysteine peptidases and malignant tumours. In: Ansorge S, Langner J: *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases*. S. 253-257, Plenum Press, New York, 1997.
44. Kirschke H, Clausen T, Göhring B, Günther D, Heucke E, Laube F, Löwe E, Neef H, Papesch H, Peinze S, Plehn G, Rebmann U, Rinne A, Rüdlich R, Weber E. Concentrations of lysosomal cysteine proteases are decreased in renal cell carcinoma compared with normal kidney. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997;123: 402-406.

45. Klemenčič I, Carmona AK, Cezari MHS, Juliano MA, Juliano L, Gunčar G, Turk D, Križaj I, Turk V, Turk B. Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. *Eur J Biochem* 2000;267:5404-5412.
46. Kos J, Werle B, Lah T, Brunner N: Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: Markers for diagnosis and prognosis in cancer. *Int J Biol Markers* 2000;15,84-99.
47. Kos J, Sekirnik A, Premzl A, Zavašnik Bergant V, Langerholc T, Turk B, Werle B, Golouh R, Repnik U, Jeras M, Turk V. Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp Cell Res* 2005;306:103-113.
48. Krüger S, Häckel C, Bühling F, Roessner A : Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Res* 1999;59:6010-6014.
49. Krüger S, Kalinski T, Hundertmark T, Wex T, Küter D, Peitz U, Ebert M, Nögler DK, Kellner U, Malfertheiner P, Naumann M, Röcken C, Roessner A : Up-regulation of cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *J Pathol* 2005;207:32-42.
50. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
51. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM: *Prinzipien der Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998.
52. Leto G, Tumminello FM, Pizzolanti G, Montalto G, Soresi M, Carroccio A, Ippolito S, Gebbia N: Lysosomal aspartic and cysteine proteinases serum levels in patients with pancreatic cancer or pancreatitis. *Pancreas* 1997;14:22-27.
53. Lindstedt L, Lee M, Öörni K, Brömme D, Kovanen PT: Cathepsins F and S block HDL₃-induced cholesterol efflux from macrophage foam cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312: 1019-1024.
54. Linnevers C, Smeekens SP, Brömme D: Human cathepsin W, a putative cysteine protease predominantly expressed in CD8⁺ T-lymphocytes. *FEBS Lett* 1997;405: 253-259.
55. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG: Principles of molecular cell biology of cancer: cancer metastasis. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. S. 134-149, Lippincott Co., Philadelphia, 1993.

56. Lorenzo K, Ton P, Clark JL, Coulibaly S, Mach L: Invasive properties of murine squamous carcinoma cells: secretion of matrix-degrading cathepsins is attributable to a deficiency in the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Cancer Res* 2000;60:4070-4076.
57. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randhall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
58. Ménard R, Storer AC: Papain. In: Barrett AJ, Rawling ND, Woessner JF Jr: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London, 1998.
59. Ménard R, Therrien C, Lachance P, Sulea T, Qi H, Alvarez-Hernandez A, Roush WR: Cathepsin X and B display distinct activity profiles that can be exploited for inhibitor design. *Biol Chem* 2001;282:839-845.
60. MEROPS: <http://merops.sanger.ac.uk> (06.03.2003)
61. Mohammadi M, Czinn S, Redline R, Nedrud J. Helicobacter-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomach of mice. *J Immunol* 1996;156:4729-4738.
62. Mulayium M, Foster Silver D, Tolgay Ocal I, Babalola E: Vulvar basal cell carcinoma: two unusual presentations and review of the literature. *Gynecol Oncol* 2002;85:532-537.
63. Nägler DK, Ménard R: Human cathepsin X: A novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Lett* 1998;434:135-139.
64. Nägler DK, Sulea T, Ménard R: Full-length cDNA of human cathepsin F predicts the presence of a cystatin domain at the N-terminus of the cysteine protease zymogen. *Biochem Biophys Res Commun* 1999a;257:313-318.
65. Nägler DK, Zhang R, Tam W, Sulea T, Purisima EO, Ménard R: Human cathepsin X: a cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry* 1999b;38:12648-12654.
66. Nägler DK, Krüger S, Kellner A, Ziomek E, Ménard R, Buhtz P, Krams M, Roessner A, Kellner U. Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 2004;60:109-119.
67. Nägler DK, Lechner AM, Oettl A, Kozaczynska K, Scheuber HP, Gippner-Steppert C, Bogner V, Biberthaler P, Jochum M. An enzyme-linked immunosorbent assay for human cathepsin X, a potential new inflammatory marker. *J Immunol Methods* 2006;308:241-250.

68. Nascimento FD, Rizzi CCA, Nantes IL, Stefe I, Turk B, Carmona AK, Nader HB, Juliano L, Tersariol ILS: Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Arch Biochem Biophys* 2005;436:323-332.
69. Niedergethmann M, Wostbrock B, Sturm JW, Willeke F, Post S, Hildenbrand R: Prognostic impact of cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 2004;29:204-211.
70. Noll S, Schaub-Kuhnen: *Praxis der Immunhistochemie*. Urban und Fischer, München, Jena, 2000.
71. Öörni K, Sneek M, Brömme D, Pentikäinen MO, Lindstedt KA, Mäyranpää M, Aitio H, Kovanen PT: Cysteine protease cathepsin F is expressed in human atherosclerotic lesions, is secreted by cultured macrophages, and modifies low density lipoprotein particles in vitro. *J Biol Chem* 2004;279:34776-34784.
72. Pennacchio LA, Lehesjoki A, Stone NE, Willour VL, Virtaneva K, Miao J, D'Amato E, Ramirez L, Faham M, Koskiniemi M, Warrington JA, Norio R, Chapelle A de la, Cox DR, Myers RM: Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EMP1). *Science* 1996;271:1731-1734.
73. Plebani M, Herszèanyi L, Cardin R, Roveroni G, Carraro P, Paoli MD, Rugge M, Grigioni WF, Nitti D, Naccarato R, Farinati F: Cysteine and serine proteases in gastric cancer. *Cancer* 1995;76:367-375.
74. Puzer L, Cotrin SS, Cezari MHS, Hirata IY, Juliano MA, Stefe I, Turk D, Turk B, Juliano L, Carmona AK. Recombinant human cathepsin X is a carboxymonopeptidase only: a comparison with cathepsins B and L. *Biol Chem* 2005;386:1191-1195.
75. Rao NV, Rao GV, Hoidal JR: Human dipeptidyl-peptidase I. Gene characterization, localization, and expression. *J Biol Chem* 1997;272:10260-10265.
76. Riese RJ, Wolf PR, Brömme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL, Chapman HA: Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 1996;4:357-366.
77. Roger P, Montcourrier P, Maudeleonde T, Brouillet JP, Pages A, Laffargue F, Rochefort H: Cathepsin D immunostaining in paraffin-embedded breast cancer cells and macrophages: correlation with cytosolic assay. *Hum Pathol* 1994; 25:863-871.
78. Saftig P, Hunziker E, Everts V, Jones S, Boyde A, Wehmeyer O, Suter A, von Figura K: Functions of cathepsin K in bone resorption. *Adv Exp Med Biol* 2000;477:293-303.

79. Salvesen GS: A lysosomal protease enters the death scene. *J Clin Invest* 2001;107: 21-22.
80. Santamaría I, Velasco G, Pendás AM, Fueyo A, López-Otín C: Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J Biol Chem* 1998;273:16816-16823.
81. Santamaría I, Velasco G, Pendás AM, Paz a, López-Otín C: Molecular cloning and structural and functional characterization of cathepsin F, a new cysteine proteinase of the papain family with a long propeptide domain. *J Biol Chem* 1999; 274:13800-13809.
82. Shi G, Webb AC, Foster KE, Knoll JHM, Lemere CA, Munger JS, Chapman HA: Human cathepsin S: Chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution. *J Biol Chem* 1994;269:11530-11536.
83. Shi G, Bryant RAR, Riese R, Verhelst S, Driessen C, Li Z, Brömme D, Ploegh HL, Chapman HA: Role for cathepsin F in invariant chain processing an major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J Exp Med* 2000;191:1177-1185.
84. Sinha AA, Wilson MJ, Gleason DF, Reddy PK, Sameni M, Sloane BF: Immunohistochemical localisation of cathepsin B in neoplastic human prostate. *Prostate* 1995;26:171-178.
85. Sivaraman J, Nägler DK, Zhang R, Ménard R, Cygler M: Crystal structure of human procathepsin X: A cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *J Mol Biol* 2000;295:939-951.
86. Sloane BF, Honn KV: Cysteine proteinases and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1984;3:249-263.
87. Sloane BF, Rozhin J, Krepele E, Ziegler G, Sameni M: The malignant phenotype and cysteine proteinases. *Biomed Biochim Acta* 1991;50:549-554.
89. Snow SN, Sahl W, Lo JS, Mohs FE, Warner T, Dekkinga JA, Feyzi J: Metastatic basal cell carcinoma. Report of five cases. *Cancer* 1994;73:328-335.
90. Somoza JR, Palmer JT, Ho JD: The crystal structure of human cathepsin F and ist implications for the development of novel immunomodulators. *J Mol Biol* 2002;322:559-568.
91. Sonderstrom M, Ekfors T, Bohling T, Aho A, Aro HT, Vuorio E: Cysteine proteinases in chondrosarcomas. *Matrix Biol* 2001;19:717-725.

92. Statistisches Bundesamt: <http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab22.htm> (06.03.2003a)
93. Statistisches Bundesamt: <http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.htm> (06.03.2003b)
94. Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim T, Cirman T, Snipas SJ, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Brömme D, Krajewski S, Reed JC, Yin X, Turk V, Salvesen GS: Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of Bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* 2001;276:3149-3157.
95. Storer AC, Ménard R: Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol* 1994;244:486-500.
96. Tang CH, Lee JW, Galvez MG, Robillard L, Mole SE, Chapman HA: Murine cathepsin F deficiency causes neuronal lipofuscinosis and late-onset neurological disease. *Mol Cell Biol* 2006;26:2309-2316.
97. Tao K, Stearns NA, Dong J, Wu QL, Sahagian GG: The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys* 1994;311:19-27.
98. Terman A, Neuzil J, Kagedal K, Ollinger k, Brunk UT: Decreased apoptotic response of inclusion-cell disease fibroblasts: a consequence of lysosomal enzyme missorting? *Exp Cell Res* 2002;274:9-15.
99. Tezuka K, Tezuka Y, Maejima A, Sato T, Nemoto K, Kamioka H, Hakeda Y, Kumegawa M: Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *J Biol Chem* 1994;269:1106-1109.
100. Tobin DJ, Foitzik K, Reinheckel T, Mecklenburg L, Botchkarev VA, Peters C, Paus R: The lysosomal protease cathepsin L is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling. *Am J Pathol* 2002;160:1807-1821.
101. Toomes C, James J, Wood AJ, Wu CL, McCormick D, Lench N, Hewitt C, Moynihan L, Roberts E, Woods CG, Markham A, Wong M, Widmer R, Ghaffar KA, Pemberton M, Hussein IR, Temtamy SA, Davies R, Read AP, Sloan P, Dixon MJ, Thakker NS: Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nature Genet* 1999;23:421-424.

102. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4354.
103. Turk B, Dolenc I, Turk V, Bieth JG: Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry* 1993;32:375-380.
104. Turk B, Turk V, Turk D: Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem* 1997;378:141-150.
105. Turk B, Turk D, Turk V: Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:98-111.
106. Turk, V, Turk B, Turk, D: Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J* 2001; 20:4629-4633.
107. Vazquez-Ortiz G, Pina-Sanchez P, Vazquez K, Duenas A, Taja L, Mendoza P, Garcia JA, Salcedo M. Overexpression of cathepsin F, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer. *BMC Cancer* 2005;5:68.
108. Wang B, Shi G, Mei Yao P Li Z, Chapman HA, Brömme D: Human cathepsin F. Molecular cloning, functional expression, tissue localization, and enzymatic characterization. *J Biol Chem* 1998;273:32000-32008.
109. Wex T, Levy B, Wex H, Brömme D: Human cathepsins F and W: a new subgroup of cathepsins. *Biochem Biophys Res Commun* 1999a;259:401-407.
110. Wex T, Wex H, Brömme D: The human cathepsin F gene - a fusion product between an ancestral cathepsin and cystatin gene. *Biol Chem* 1999b; 380:1439-1442.
111. Wiederanders B: The function of propeptide domains of cysteine proteinases. *Adv Exp Med Biol* 2000;477:261-270.
112. Willstätter R, Bamann E: Über die Proteasen der Magenschleimhaut. Erste Abhandlung über die Enzyme der Leukozyten. *Hoppe-Syler's Z Physiol Chemie* 1929;180,127-143.
113. World Health Organization (WHO): The World Health Report 1999, Genf, 1999.
114. World Health Organization (WHO): The World Health Report 2000, Genf, 2000.
115. World Health Organization (WHO): The World Health Report 2001, Genf, 2001.

116. World Health Organization (WHO): The World Health Report 2002, Genf, 2002.
117. Wurl P, Taubert H, Meye A, Dansranjav T, Weber E, Gunther D, Berger D, Schmidt H, Dralle H, Rath FW: Immunohistochemical and clinical evaluation of cathepsin expression in soft tissue sarcomas. *Virchows Arch* 1997;430:221-225.
118. Yan S, Sameni M, Solane BF: Cathepsin B and human tumor progression. *Biol Chem* 1998;379:113-123.

7 Abbildungsverzeichnis

	Blatt
Abb. 1: Weltweite Mortalitätsrate bedingt durch Malignome.....	7
Abb. 2: Schematische Darstellung der phylogenetischen Beziehungen der humanen Cystein-Proteasen der Papain-Familie	12
Abb. 3: Schematische Darstellung der Größe der Kathepsine F und X.....	16
Abb. 4: Aminosäuresequenz der Proregion von Kathepsin F.....	17
Abb. 5: Aminosäuresequenz des reifen Kathepsin F.....	17
Abb. 6: Aminosäuresequenz der Proregion von Kathepsin X.....	20
Abb. 7: Aminosäuresequenz des reifen Kathepsin X.....	20
Abb. 8: Altersverteilung je Dekade.....	24
Abb. 9: Kathepsin F und X. Vergleich von Normal- und Tumorgewebe.....	36
Abb. 10: Kathepsin F. Vergleich der histologischen Differenzierungsgrade.....	37
Abb. 11: Kathepsin X. Vergleich der histologischen Differenzierungsgrade.....	38
Abb. 12: Immunhistochemische Abbildungen, Kathepsin F und X.....	41
Abb. 13: Western Blot, Kathepsin F.....	42
Abb. 14: Western Blot, Kathepsin X.....	42

8 Tabellenverzeichnis

	Blatt
Tab. 1: Sterbefälle in Deutschland (2000).....	8
Tab. 2: Neuerkrankungsfälle an den häufigsten Malignomen in Deutschland (2000).....	8
Tab. 3: Sterbefälle an den häufigsten Malignomen in Deutschland (2000).....	9
Tab. 4: Frischmaterial für den Western Blott.....	24
Tab. 5: Immunreaktivitätswert.....	33
Tab. 6: Kathepsin F und X. Vergleich von Normal- und Tumorgewebe.....	34
Tab. 7: Kathepsin F und X. Vergleich von epithelialen und mesenchymalen Tumorgeweben.....	35
Tab. 8: Kathepsin F und X. Vergleich des Normalgewebes mit dem entsprechenden epithelialen Tumor.....	35
Tab. 9: Kathepsin F und X. Vergleich des Normalgewebes mit dem entsprechenden mesenchymalen Tumor.....	35
Tab. 10: Kathepsin X. Vergleich der histologischen Differenzierungsgrade.....	37
Tab. 11: Kathepsin X. Vergleich der histologischen Differenzierungsgrade.....	37

9 Anlage

#	A	S	Gewebe	pathologische Diagnose	G	Kathepsin F		Kathepsin X	
						N	T	N	T
1	61	M	Ösophagus	Plattenepithel-Ca	1	0,5 +	0,3 0	0,5 +	0,5 +
2	57	M	Ösophagus	Plattenepithel-Ca	2	0,2 0	0,6 +	0 0	0,8 +
3	46	M	Ösophagus	Plattenepithel-Ca	2	0,5 +	0,2 0	0 0	0,8 +
4	77	M	Magen	Adeno-Ca, intestinaler Typ	2	0 0	0 0	0 0	0,7 +
5	56	M	Magen	Adeno-Ca, intestinaler Typ	3		1,1 +		1,3 +
6	63	M	Magen	Adeno-Ca, diffuser Typ	3	0 0	0 0	0,1 0	1,0 +
7	77	F	Duodenum			0 0		2,5 +++	
8	60	M	Ileum			0 0		1,5 ++	
9	79	M	Ileum			0 0		0,4 0	
10	68	M	Kolon	Adeno-Ca	1	0 0	0,3 0	0,5 +	1,7 ++
11	60	M	Kolon	Adeno-Ca	1	0 0	0,3 0	0,8 +	1,5 ++
12	70	M	Kolon	Adeno-Ca	2	0 0	0 0	0 0	0,1 0
13	87	M	Kolon	Adeno-Ca	2		0,1 0		1,3 +
14	45	F	Kolon	Adeno-Ca	2	0 0	0,1 0	1,4 +	1,5 ++
15	74	F	Kolon	Adeno-Ca	2		0 0		1,4 +
16	59	M	Kolon	Adeno-Ca	3	0,1 0	0,2 0	1,9 ++	2,2 ++
17	55	M	Kolon	Adeno-Ca	3	0,1 0	0,1 0	1,5 ++	2,0 ++
18	60	M	Kolon	Adeno-Ca	3	0 0	0 0	0,8 +	2,2 ++
19	74	M	Anus	Plattenepithel-Ca	2		0,1 0		0,7 +
20	56	M	Leber	Hepatozelluläres Ca	2	0 0	0,6 +	2,5 +++	2,7 +++
21	64	M	Leber	Cholangiozelluläres Ca	2	0 0	0,1 0	2,0 ++	1,6 ++
22	53	F	Leber	Cholangiozelluläres Ca	3	0 0	0 0	2,5 +++	0,4 0
23	55	M	Lunge	Adeno-Ca	2	0,8 +	0,3 0	1,8 ++	2,4 ++
24	71	M	Lunge	Adeno-Ca	2	0 0	0 0	0,7 +	1,5 ++
25	74	M	Lunge	Adeno-Ca	2	0 0	0 0	1,5 ++	2,0 ++
26	63	M	Lunge	Adeno-Ca	3	0 0	0 0	0,4 0	0,9 +
27	73	M	Lunge	Plattenepithel-Ca	1	0 0	0 0	0 0	0,1 0
28	70	M	Lunge	Plattenepithel-Ca	2	0 0	0 0	1,1 +	0,6 +
29	71	F	Lunge	Plattenepithel-Ca	2	0 0	0 0	1,6 ++	2,0 ++
30	56	M	Lunge	Plattenepithel-Ca	3	0 0	0 0	0,4 0	1,0 +
31	66	M	Lunge	Plattenepithel-Ca	3	0 0	0 0	0,6 +	0,3 0
32	48	M	Lunge	Großzelliges Ca	3	0 0	0 0	0,5 +	0,1 0
33	65	M	Lunge	Kleinzelliges Ca		0 0	0 0	0,7 +	0 0
34	71	F	Pankreas	Duktales Adeno-Ca	1	0 0	0 0	0 0	0,1 0
35	66	M	Pankreas	Duktales Adeno-Ca	2	0 0	0 0	0 0	0 0
36	78	M	Schilddrüse	Medulläres Ca		0 0	0 0	0 0	0,5 +
37	34	F	Schilddrüse	Medulläres Ca		0 0	0 0	0 0	0,4 0
38	66	F	Schilddrüse	Papilläres Ca		0 0	0 0	0 0	0,2 0
39	73	M	Schilddrüse	Papilläres Ca			0 0		0,3 0
40	53	M	Schilddrüse	Follikuläres Ca		0 0	0 0	0 0	0,8 +
41	49	M	Schilddrüse	Follikuläres Ca		0 0	0 0	0 0	0 0
42	57	M	Niere	Klarzelliges Ca	2	0 0	0 0	2,6 +++	0,4 0
43	71	M	Niere	Klarzelliges Ca	2		0,1 0		2,4 ++
44	72	F	Niere	Chromophiles Ca	2	0 0	0 0	1,9 ++	1,9 ++
45	69	F	Niere	Chromophobes Ca	2	0 0	0,1 0	2,3 ++	1,4 +
46	74	M	Harnblase			0,1 0		0 0	
47	68	F	Harnblase	Urothel-Ca	3		0 0		1,1 +
48	57	F	Mamma	Lobuläres Ca	2		0 0		0,1 0
49	76	F	Mamma	Duktales Ca	2	0 0	0,1 0	0 0	0,8 +
50	51	F	Mamma	Duktales Ca	3		0,1 0		1,2 +
51	60	F	Ovar	Serös-papilläres Adeno-Ca	2		0,1 0		1,1 +
52	70	F	Ovar	Serös-papilläres Adeno-Ca	2		0 0		0,1 0
53	64	F	Ovar	Serös-papilläres Adeno-Ca	3		0,2 0		1,7 ++

54	69	F	Ovar	Serös-papilläres Adeno-Ca	3			0,1	0			1,3	+
55	60	F	Ovar	Endometrioides Adeno-Ca	2	0	0	0	0	0	0	0,4	0
56	36	F	Zervix uteri	Plattenepithel-Ca	2	0,4	0	0,1	0	0	0	0,4	0
57	30	F	Zervix uteri	Plattenepithel-Ca	3			0,6	+			1,0	+
58	73	F	Vagina	Malignes Melanom		0	0	0	0	0	0	0,4	0
59	77	F	Labium majus	Malignes Melanom		0	0	0	0	0	0	0,3	0
60	77	F	Kutis	Basaliom		0	0	0	0	0	0	0	0
61	64	M	Kutis	Basaliom		0	0	0	0	0	0	0,2	0
62	70	F	Lymphknoten	Zentroblastisches Lymphom				0	0			0,2	0
63	46	M	Knochen	Chondrosarkom	1			1,4	+			0,2	0
64	62	M	Knochen	Chondrosarkom	1			0,2	0			0,3	0
65	68	F	Knochen	Chondrosarkom	1			0,1	0			0,2	0
66	70	F	Knochen	Chondrosarkom	2	0,8	+	1,7	++	0	0	0,6	+
67	62	M	Knochen	Chondrosarkom	2			0,2	0			0,1	0
68	68	F	Knochen	Chondrosarkom	3			0,1	0			0,1	0
69	61	F	Weichgewebe	Malignes fibröses Histiozytom	2			0	0			1,5	++
70	26	M	Weichgewebe	Malignes fibröses Histiozytom	3			0	0			1,5	++
71	66	F	Weichgewebe	Malignes fibröses Histiozytom	3			0	0			0,6	+
72	63	M	Muskel	Leiomyosarkom	1			0,1	0			0,5	+
73	45	M	Muskel	Leiomyosarkom	1			0,2	0			0,6	+
74	70	M	Muskel	Leiomyosarkom	2			0,1	0			0,3	0
75	64	F	Muskel	Leiomyosarkom	2			0,1	0			0,1	0
76	61	F	Muskel	Leiomyosarkom	3			0	0			0,1	0
77	68	F	Muskel	Leiomyosarkom	3			0,1	0			0,6	+
78	23	F	Muskel	Rhabdomyosarkom	3			0,1	0			1,4	+
79	21	F	Weichgewebe	Liposarkom	1			0,5	+			1,2	+
80	45	M	Weichgewebe	Liposarkom	1			0,1	0			0,5	+
81	65	M	Weichgewebe	Liposarkom	1			0	0			0	0
82	54	M	Weichgewebe	Liposarkom	2	0	0	0	0	0	0	0,5	+
83	61	M	Weichgewebe	Liposarkom	3	0	0	0	0	0	0	0,9	+

Anlage: Immunhistochemische Auswertung der Verteilung von Kathepsin F und X. Angegeben ist der oben beschriebene Immunreaktivitätswert IRW sowie der Grad der Positivität der Färbung (0 bis +++) jeweils für Normal- (N) und tumoröses Gewebe (T). Grau unterlegte Felder: kein Tumorgewebe vorhanden/kein Grading; A = Alter [Jahre], S = Geschlecht, M = Mann, F = Frau, G = Grading, Ca = Karzinom.

Danksagung

An dieser Stelle sei allen Beteiligten, die an der Erstellung dieser Arbeit mitgewirkt haben, ausdrücklich gedankt.

Herrn Prof. Dr. med. A. Roessner, Direktor des Institutes für Pathologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, danke ich für die Möglichkeit, diese Promotion durchführen zu können.

Für die Vergabe des Themas und die Betreuung bedanke ich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. U. Kellner, seinerzeit Oberarzt am hiesigen Institut für Pathologie, jetzt Chefarzt am Institut für Pathologie, Klinikum Minden/Westfalen.

Bei Frau Dr. rer. biol. hum. D. Nägler, die ebenfalls nicht mehr am Institut für Pathologie, sondern jetzt an der Ludwig-Maximilians-Universität München tätig ist, bedanke ich mich sehr für die Einführung in diese Promotion sowie in die „Welt der Wissenschaft“.

Ein ganz besonderer Dank geht an die medizinisch-technischen Assistentinnen am Institut für Pathologie, vornehmlich Frau M. Stoklasek und Frau C. Krüger aus dem protein- bzw. immunhistochemischen Labor, die mir stets mit Rat und Tat hilfreich zur Seite standen.

Frau Dr. med. K. Jentsch-Ullrich und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. M. Koenigsmann, beide Oberärzte an der Klinik für Hämatologie/Onkologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, sei für die Durchsicht der Dissertation und die konstruktive Kritik gedankt.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders herzlich für die Unterstützung während meines Studiums, ohne die Vieles sicherlich nicht möglich gewesen wäre.

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Immunhistochemischer Nachweis von Kathepsin F und X
in Normalgeweben und Malignomen**

im Institut für Pathologie

mit Unterstützung durch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. U. Kellner

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- und ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 01.07.2006

Enrico Schalk

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Enrico Schalk
Adresse: Mehringstraße 31
39114 Magdeburg

Geburtsdatum, -ort: 18.10.1977, Wernigerode
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1984-1991 Polytechnische Oberschule, Elbingerode
1991-1996 Gymnasium Hochharz, Elbingerode

Wehrdienst:

07/1996-09/1996 Grundausbildung, Horb am Neckar
09/1996-04/1997 Sanitätsdienst, Fulda

Hochschulausbildung:

10/1997-12/2003 Studium der Humanmedizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Beruflicher Werdegang:

12/2003-09/2004 Arzt im Praktikum, Klinik für Hämatologie/Onkologie, Universitätsklinikum Magdeburg
seit 10/2004 Assistenzarzt, Klinik für Hämatologie/Onkologie, Universitätsklinikum Magdeburg

Mitgliedschaften:

Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), Wiesbaden
Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), Berlin
European Hematology Association (EHA), Rotterdam, NL
Ostdeutsche Studiengruppe für Hämatologie und Onkologie (OSHO), Leipzig

Publikationen:

Schalk E, Mohren M, Koenigsmann M, Buhtz P, Franke A, Jentsch-Ullrich K: Metastatic neuroblastoma in an adult. Onkologie 2005;28:353-355.

Schalk E, Koenigsmann M, Franke A: Akute myeloische Leukämie mit pulmonaler Manifestation. Pneumologie 2005;59:588-591 [Erratum: Pneumologie 2005;59:782].

Scheinpflug K, Schalk E, Reschke K, Franke A, Mohren M: Diabetes insipidus due to herpes encephalitis in a patient with diffuse large cell lymphoma. A case report. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2006;114:31-34.

Schalk E, Mohren M, Jentsch-Ullrich K, Dombrowski F, Franke A, Koenigsmann M: Zygomycoses in patients with acute leukaemia. Ann Hematol 2006;85:327-332.

Magdeburg, den 01.07.2006

Enrico Schalk